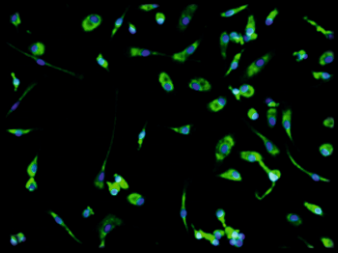


JULIA MÜLLER

Vergleichende Untersuchung zirkulierender Fibrozyten
bei Patienten mit idiopathischer pulmonalarterieller und
chronisch thrombembolischer pulmonaler Hypertonie



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Vergleichende Untersuchung zirkulierender Fibrozyten
bei Patienten mit idiopathischer pulmonalerarterieller und
chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertonie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Julia Müller
aus Bad Oldesloe

Gießen, 2015

Aus dem Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik II
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. med. R. Voswinckel

Gutachter: Prof. Dr. med. C. Heiß

Tag der Disputation: 28.07.2015

Inhaltsverzeichnis

Vergleichende Untersuchung zirkulierender Fibrozyten bei Patienten mit idiopathischer pulmonalerarterieller und chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertonie	I
Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Pulmonale Hypertonie.....	1
1.1.1 Krankheitsbild und Klassifikation.....	1
1.1.2 Vaskuläre Umbauprozesse.....	4
1.1.3 Therapie.....	7
1.2 Die Zellreihe der zirkulierenden Fibrozyten.....	14
1.2.1 Überblick über die Charakteristika zirkulierender Fibrozyten	14
1.2.2 Die Rolle zirkulierender Fibrozyten in Krankheitsprozessen	16
1.2.2 Einfluss der zirkulierenden Fibrozyten auf das pulmonalvaskuläre Remodeling	19
2 Fragestellung	21
3 Material	22
3.1 Zellisolierung und Immunfluoreszenzfärbungen.....	22
3.1.2 Antikörper	23
4 Methoden.....	26
4.1 Patientenkollektiv/Probanden.....	26
4.1.1 Ein – und Ausschlusskriterien	26
4.1.1.1 Einschlusskriterien	26
4.1.1.2 Ausschlusskriterien	26
4.1.2 Einverständniserklärung	26
4.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	26
4.3 Quantitative Untersuchung der adhärenenten Zellen.....	28
4.4 Immunfluoreszenzfärbung der Zellkammern.....	28
4.5 MTT Test	28
4.6 ELISA.....	29
4.7 Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinmaterial.....	30
4.8 Statistik	31
5 Ergebnisse	32

5.1	Charakterisierung des Studienkollektivs	32
5.2	Quantitative Untersuchung sowie immunhistochemische Darstellung der adhärennten Zellen	32
5.3	MTT-Test	35
5.4	ELISA.....	36
5.5	Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinmaterial.....	42
6	Diskussion	44
6.1	Das Studienkollektiv.....	44
6.2	Die vergleichende Quantifizierung der Fibrozyten <i>in vitro</i> und Untersuchung ihrer Viabilität	45
6.3	PDGF-BB im peripheren Blut von IPAH- und CTEPH- Patienten	46
6.4	CCL21 und CXCL12 im peripheren Blut von IPAH- und CTEPH- Patienten	48
6.5	Ausblick	51
	Zusammenfassung.....	52
	Summary	53
	Abkürzungsverzeichnis	54
	Abbildungsverzeichnis	56
	Tabellenverzeichnis	58
	Literaturverzeichnis	59
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	65
	Danksagung.....	66

1 Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

1.1.1 Krankheitsbild und Klassifikation

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist gekennzeichnet durch einen progressiven Anstieg des Gefäßwiderstands und eines Anstiegs des Blutdrucks im Lungenkreislauf. Ein maximaler pulmonalarterieller Mitteldruck (mean pulmonary arterial pressure – mPAP) mit Werten bis zu 20 mmHg, in körperlicher Ruhe gemessen, gilt als physiologisch (Olschewski 2008). Als grenzwertig werden Werte zwischen 21 und 25 mmHg eingestuft. Eine manifeste PH definiert sich durch einen mPAP ab 25 mmHg, gemessen mittels Rechtsherzkatheter (Reichenberger and Voswinckel 2011).

Die klinischen Erstmanifestationen der PH sind unspezifisch und treten als Belastungsdyspnoe, Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Thoraxmissempfindungen in Erscheinung. Als Folge der chronischen pulmonalvaskulären Widerstandserhöhung kommt es zu einer chronischen Rechtsherzbelastung mit Ausbildung eines Cor pulmonale. Es zeigen sich die Symptome eines Rechtsherzversagens mit Ödemen, Halsvenenstauung und Hepatomegalie. Pathognomisch ist im fortgeschrittenen Stadium das Auftreten von Synkopen (Reichenberger and Voswinckel 2011).

Der funktionelle Schweregrad der PH wird anhand einer modifizierten NYHA-Klassifikation in vier Stadien basierend auf der klinischen Symptomatik eingeteilt (Tabelle 1). Unter Hinzunahme der hämodynamischen Parameter lässt sich diese Klassifikation folgendermaßen ergänzen: eine leichte PH ist definiert als mPAP-Wert \leq 35 mmHg bei gleichzeitig guter rechtsventrikulärer Funktion. Bei Werten zwischen 35 mmHg und 40 mmHg ist die PH als mittelschwer anzusehen. Eine schwere PH liegt vor, wenn bereits eine Rechtsherzinsuffizienz besteht und der mPAP bei Werten \geq 40 mmHg liegt (Olschewski, Hoeper et al. 2007).

Klasse 1	Patienten mit pulmonaler Hypertonie ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Normale körperliche Belastung führt nicht zu vermehrter Dyspnoe, Müdigkeit oder thorakalen Schmerzen
Klasse 2	Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit leichter Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Normale körperliche Belastung führt zu vermehrter Dyspnoe, Müdigkeit oder thorakalen Schmerzen.
Klasse 3	Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Bereits leichte Belastung führt zu vermehrter Dyspnoe, Müdigkeit oder thorakalen Schmerzen.
Klasse 4	Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit Unfähigkeit, körperliche Belastung ohne Beschwerden auszuführen. Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz. Beschwerden bereits in Ruhe.

Tabelle 1: Funktionelle Schweregrade der pulmonalen Hypertonie.

Nach der Evian-Konferenz 1998 (Barst, McGoon et al. 2004).

Die Diagnosestellung der PH sowie die Differenzierung in die jeweiligen Untergruppen erfolgt anhand eines Diagnosealgorithmus mittels nicht-invasiver und invasiver Messmethoden (Galie, Hoeper et al. 2009). Hierbei ist die transthorakale Echokardiographie die Methode der Wahl zum Screening bei Verdacht auf das Vorliegen einer PH (Reichenberger and Voswinckel 2011). Als sensitivstes Verfahren zur Abklärung einer thrombembolischen Genese der PH kommt die Perfusions-/Ventilationsszintigraphie zum Einsatz.

Zur definitiven Diagnosestellung einer präkapillären PH ist eine Rechtsherzkatheteruntersuchung unverzichtbar. Aus dem gemessenen mPAP und dem linksatrialen Druck (entsprechend dem pulmonalkapillären Verschlussdruck, auch Wedge-Druck) sowie dem Herzzeitvolumen lässt sich dabei der pulmonale Gefäßwiderstand berechnen (Leschke, Wadlich et al. 2009).

1973 wurde auf der ersten internationalen Konferenz der PH eine erste Klassifikation erarbeitet und in der Folge nach klinischen, pathophysiologischen und therapeutischen Überlegungen mehrfach überarbeitet. Die aktuelle Fassung wurde auf dem fünften Welt-Symposium der PH 2013 in Nizza, Frankreich erstellt.

In der ersten von fünf Kategorien werden die Formen der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) zusammengefasst und gegen die pulmonale Hypertonie als Folge von Linksherzerkrankungen, Lungenerkrankungen, thrombembolischer Erkrankungen oder seltener Erkrankungen abgegrenzt (Tabelle 2).

Die vorliegende Studie befasst sich vergleichend mit der PAH, im Speziellen der idiopathischen pulmonalen Hypertonie (IPAH, Gruppe 1) sowie der chronischen thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH, Gruppe 4).

<p>1. Pulmonary arterial hypertension</p> <ul style="list-style-type: none"> 1.1 Idiopathic PAH 1.2 Heritable PAH 1.3 Drug and toxin induced 1.4 Associated with <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1 Connective tissue disease 1.4.2 HIV infection 1.4.3 Portal hypertension 1.4.4 Congenital heart diseases 1.4.5 Schistosomiasis 1[°]. Pulmonary veno-occlusive diseases and/or pulmonary capillary hemangiomatosis 1^{°°}. Persistent pulmonary hypertension of the newborn
<p>2. Pulmonary hypertension due to left heart disease</p> <ul style="list-style-type: none"> 2.1 Left ventricular systolic dysfunction 2.2 Left ventricular diastolic dysfunction 2.3 Valvular disease 2.4 Congenital/acquired left heart inflow/outflow tract obstruction and congenital cardiomyopathies
<p>3. Pulmonary hypertension due to lung diseases and/or hypoxia</p> <ul style="list-style-type: none"> 3.1 Chronic obstructive pulmonary disease 3.2 Interstitial lung disease 3.3 Other pulmonary diseases with mixed restrictive and obstructive pattern 3.4 Sleep-disordered breathing 3.5 Alveolar hyperventilation disorders 3.6 Chronic exposure to high altitude 3.7 Developmental lung diseases
<p>4. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH)</p>
<p>5. Pulmonary hypertension with unclear multifactorial mechanisms</p> <ul style="list-style-type: none"> 5.1 Hematologic disorders: chronic hemolytic anemia, myeloproliferative disorders, splenectomy 5.2 Systemic disorders: sarcoidosis, pulmonary histiocytosis, lymphangioleiomyomatosis 5.3 Metabolic disorders: glycogen storage disease, Gaucher disease, thyroid disorders 5.4 Others: tumoral obstruction, fibrosing mediastinitis, chronic renal failure, segmental PH

Tabelle 2: Klassifikation der PH

Die Klassifikation erfolgt gemäß des Vorschlags des „5. World Symposium on Pulmonary Hypertension“, Nizza 2013; modifiziert nach Simonneau et al. (Simonneau, Gatzoulis et al. 2013).

1.1.2 Vaskuläre Umbauprozesse

Das Gefäßsystem der Lunge ist ein Niederdrucksystem mit besonderen Mechanismen der Widerstandsreduktion bzw. Druckregulierung. Bei Steigerung des Herzzeitvolumens können sich die Lungengefäße druckpassiv dehnen (Distension) und in Ruhe kollabierte Gefäßareale können druckpassiv perfundiert werden (Recruitment). Dementsprechend sind die Wände der Pulmonalarterien dünn.

Bei der PAH kommt es zu strukturellen Veränderungen des Gefäßbetts, die auch als pulmonalvaskuläres Remodeling bezeichnet werden. Zu beobachten ist ein Umbau von Pulmonalarterien, insbesondere der kleinen Kaliber, mit initialer Mediahypertrophie und bindegewebiger Intimaverbreiterung sowie fibroproliferativen Veränderungen der Adventitia. In nahezu allen diesen Veränderungen sind mehr oder weniger ausgeprägt Zellen nachweisbar, die α -SMA (smooth muscle α -actin) exprimieren (Humbert, Morrell et al. 2004). Weder die Herkunft noch die molekularen Mechanismen, die zur Akkumulation dieser α -SMA⁺ Zellen führen sind bislang vollständig beschrieben (Stenmark, Frid et al. 2010).

Als Epiphänomen hochgradiger und fortgeschrittener PAH sind sogenannte „plexiforme Läsionen“ der Pulmonalarterien zu beobachten (Jonigk, Golpon et al. 2011). Plexiforme Läsionen sind durch ein glattmuskuläres Interstitium verbundene, komplexe Proliferate endothelial ausgekleideter Blutkanäle, die sich teils aus den Pulmonalarterien ausstülpfen, teils auch intravaskulär gelegen sind. Meist werden sie von einem inflammatorischen Infiltrat umgeben. Zudem zeigen sich bei schwerer PAH In-situ-Thrombosierungen (Jonigk, Hoeper et al. 2012).

Auslösemechanismen für die strukturellen Gefäßwandveränderungen bei der PAH können unter anderem Hypoxie, Inflammation oder mechanische Reize sein (Barst 2005; Burke, Frid et al. 2009).

Auslösemechanismus, der zur Entwicklung einer CTEPH führt, ist die rezidivierende Lungenembolie mittlerer oder kleinerer Pulmonalarterien (Hoeper, Mayer et al. 2006). Histopathologisch zeichnet sich die CTEPH durch eine diskontinuierliche, teils exzentrische, teils vollständige Obliteration der Pulmonalarterien durch persistierende organisierte intraluminale Thrombi aus. In deren Folge kommt es zu einem zusätzlichen progressiven Umbauprozess der unverschlossenen arteriolären Lungenstrombahn, der auch als „small vessel disease“ (SVD) bezeichnet wird (Hoeper, Mayer et al. 2006). Gefördert wird das Geschehen durch erhöhte Scherkräfte, lokales Entzündungsgeschehen und eine Dysbalance von vasoaktiven Mediatoren. Die Umbauprozesse des SVD bieten einen Erklärungsansatz für das Fortschreiten der

pulmonalen Hypertension auch in Abwesenheit von Re-Embolien bei Patienten mit CTEPH.

Die histopathologischen Veränderungen der kleinen Pulmonalarterien bei der CTEPH zeigen Überschneidungen zu den Veränderungen des fortgeschrittenen vaskulären Remodelings bei der PAH. So können in beiden Formen der PH eine proliferative Intimafibrose neben plexiformen Läsionen mit umgebendem Entzündungszellinfiltrat und intraluminalen Thrombi beobachtet werden. (Galie and Kim 2006). Daraus können sich Schwierigkeiten in der histomorphologischen Unterscheidung einer PAH und einer distalen CTEPH ergeben (Abbildungen 1 und 2).

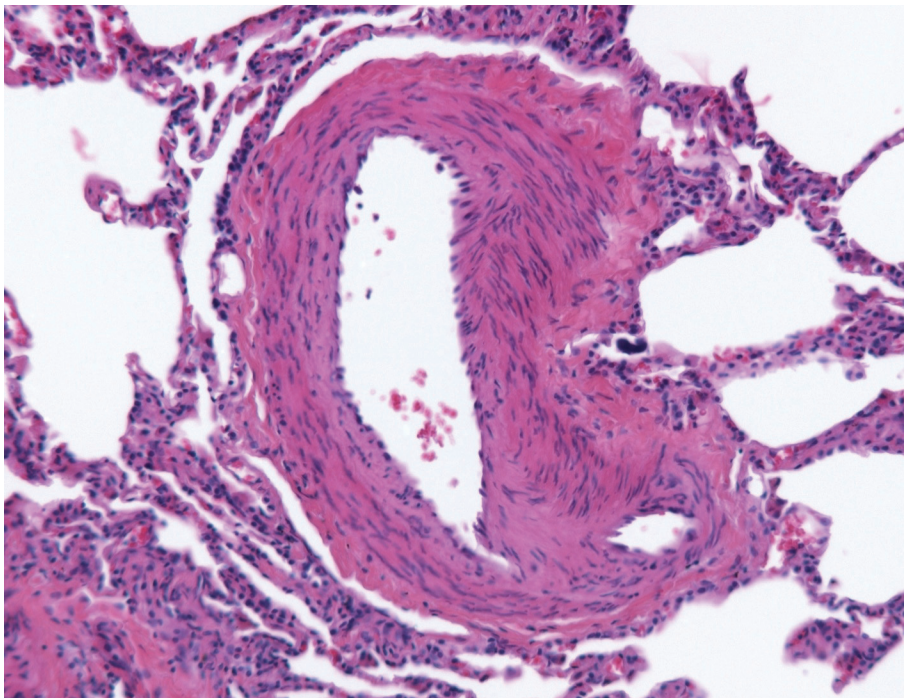


Abbildung 1: Histomorphologische Merkmale der PAH

Mediahypertrophie einer kleinen muskulären Pulmonalarterie mit Intimaproliferation und beginnender plexiformer Läsion (20fach vergrößert).

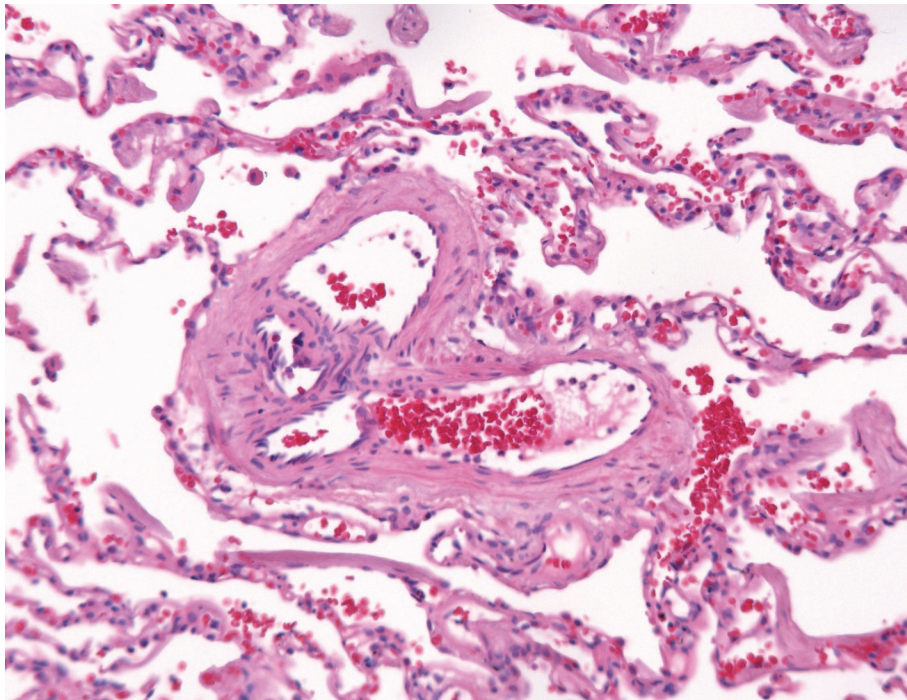


Abbildung 2: Histomorphologische Merkmale der CTEPH

Angedeutet netzartig imponierende Residuen eines nahezu vollständig organisierten Pulmonalarterienthrombus mit endothelial ausgekleideten Sekundärlumina und Intimaproliferation (20fach vergrößert).

Die morphologische Graduierung der PAH erfolgt nach Heath und Edwards (Tabelle 3), wobei die Grade 4 bis 6 lediglich morphologische Merkmale der PAH beschreiben und keine kontinuierliche Steigerung der „Intensität“ der Gefäßveränderungen darstellen (Jonigk, Hoeper et al. 2012).

Grad 1	Mediahypertrophie der muskulären Pulmonalarterien sowie Einsprossung glatter Muskelzellen in die distalen Arteriolen
Grad 2	Unregelmäßige, zellreiche Intimaproliferation, begrenzt auf die kleinen muskulären Pulmonalarterien
Grad 3	Mediahypertrophie der muskulären Pulmonalarterien und konzentrische Intimafibrose (konzentrische Läsionen)
Grad 4	<i>Beginnende Aussackung von Pulmonalarterien und fokaler Nachweis plexiformer Läsionen</i>
Grad 5	<i>Ausgeprägte Dilatation von Pulmonalarterien sowie multifokaler Nachweis plexiformer und angiomatoider Läsionen; umschriebene Hämosiderose</i>
Grad 6	<i>Nekrotisierende Arteriitis</i>

Tabelle 3: Graduierung der pulmonalarteriellen Hypertonie (Heath and Edwards 1958)

Einen wesentlichen Einfluss auf den Gefäßtonus der Pulmonalarterien und vaskuläre Umbauprozesse nimmt das Endothel. Eine endotheliale Dysfunktion führt zum Verlust seiner vasoprotektiven Eigenschaften mit Verschiebung des Gleichgewichts der Mediatoren hin zu vasokonstriktorisches und proliferativen Faktoren. Sie trägt somit maßgeblich zur Entstehung und Progression der PH bei (Budhiraja, Tuder et al. 2004). Bei der Manifestation der PAH spielen darüber hinaus auch genetische Faktoren eine Rolle. Es konnte nachgewiesen werden, dass 70% der Patienten mit hereditärer pulmonalarterieller Hypertonie (HPAH) und 20% der IPAH-Patienten eine Mutation im Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2 (BMPR2) auf dem Chromosom 2q31-32 aufweisen. Zu einem Funktionsverlust des BMPR2-Gens führen verschiedene Mutationen wie eine Frameshift-, Nonsense- oder De-novo-Mutation. Das BMPR2-Gen kodiert für einen Membranrezeptor der TGF- β -Superfamilie und wirkt darüber regulatorisch auf Zellwachstum, Differenzierungsvorgänge, Migration und Apoptose. Ein Verlust der Funktion dieses Gens begünstigt das vaskuläre Remodeling und somit die Entstehung einer PAH (Machado, Eickelberg et al. 2009). 2003 konnten Du et al. 2003 nachweisen, dass die Expression von BMPR-2 auch bei CTEPH-Patienten erhöht ist (Du, Sullivan et al. 2003).

Weitere bekannte Gene der TGF- β -Superfamilie sind das Activin Receptor-Like Kinase 1-Gen (ALK1) und Endoglin-Gen (ENG). Mutationen dieser Gene sind überwiegend mit Formen der hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie (HHT) assoziiert (Machado, Eickelberg et al. 2009).

1.1.3 Therapie

Als allgemeine Verhaltensregel sollten PH-Patienten übermäßige körperliche Anstrengung vermeiden. Die Basistherapie beinhaltet eine orale Antikoagulation (Bergovec, Udovicic et al. 2011) sowie eine frühzeitige Infekttherapie. Eine diuretische Therapie ist bei klinischen Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz indiziert. Zudem sollte ggf. eine Langzeitsauerstofftherapie erwogen werden. Es wird generell empfohlen, die arterielle Sauerstoffsättigung über 90 % zu halten, da chronische Hypoxie einen bedeutenden Faktor für die Vasokonstriktion darstellt (McLaughlin, Presberg et al. 2004).

In der medikamentösen Therapie kommen verschiedene vasoaktive Substanzen zum Einsatz.

Calciumantagonisten

Calciumantagonisten blockieren den Calciumeinstrom in die Myozyten des pulmonalvaskulären Systems und bewirken so eine Gefäßdilatation. Geeignet für eine langfristige Therapie mit Calciumantagonisten sind lediglich PAH-Patienten, die zu den sogenannten Vasoreagibilitäts-Test Respondern zählen.

Um diese zu identifizieren wird im Rahmen einer Rechtsherzkatheter-Untersuchung eine Vasoreagibilitäts-Testung mit einem kurzwirksamen Vasodilatans (z. B. inhaliertes Stickstoffmonoxid (NO) oder inhaliertes Iloprost durchgeführt. Fällt hierbei der pulmonalarterielle Mitteldruck um mindestens 10 mmHg unter einen Absolutwert von 40 mmHg bei normalisiertem Herzzeitvolumen, ist eine Therapie mit Calciumantagonisten indiziert (Sitbon, Humbert et al. 2005).

Prostazyklinderivate

Bei der PAH ist die Prostazyklinproduktion im Endothel und die Expression der Prostazyklinsynthase vermindert (Galie, Manes et al. 2003). Neben der thrombozytenhemmenden, antiinflammatorischen und antiproliferativen Wirkung führen Prostazykline zu einer erhöhten intrazellulären cAMP Konzentration und konsekutiv zur Gefäßdilatation (Abbildung 3). Die Therapie mit Prostazyklinderivaten kann intravenös (Epoprostenol, Iloprost, Treprostenil), subkutan (Treprostinil) sowie inhalativ (Iloprost, Treprostinil) erfolgen. Das oral verfügbare Prostazyklin Beraprost war in klinischen Studien häufig mit Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen oder Übelkeit vergesellschaftet und erwies sich als wenig effektiv (Galie, Humbert et al. 2002). Eine weitere Studie zu oralem Treprostinil erreichte den primären Endpunkt nicht (Tapson, Torres et al. 2012).

Endothelin-Rezeptorantagonisten

Bei PAH- Patienten konnte eine Aktivierung des Endothelin-Systems sowohl im Plasma als auch im Lungengewebe nachgewiesen werden (Giaid, Yanagisawa et al. 1993). Endothelin-1 induziert vasokonstriktive entzündliche und proliferative Vorgänge durch Bindung an den Endothelinrezeptor A (ETA) und den Endothelinrezeptor B (ETB) in vaskulären glattmuskulären Zellen (Abbildung 3). Zudem exprimieren Endothelzellen ETB, dessen Aktivierung zur Bereitstellung von NO und Prostazyklinen führt und dem schädlichen Effekt von Endothelin-1 entgegenwirkt. In Deutschland zugelassen sind zur Zeit der duale Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan und die selektiven ETA-Antagonisten Sitaxentan und Ambrisentan.

Phosphodiesterase-Inhibitoren

Es besteht die Möglichkeit mittels Phosphodiesterase-Inhibitoren in den Stickstoffmonoxid–Stoffwechsel einzugreifen (Abbildung 3). Die drei zur Behandlung der erektilen Dysfunktion verwendeten Phosphodiesterase-5-Inhibitoren Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil vermitteln über den intrazellulären Anstieg des Botenstoffes cGMP eine Vasodilatation mit einem Maximum nach jeweils 60, 75 - 90 bzw. 40 - 45 Minuten (Ghofrani, Voswinckel et al. 2004). Zudem besitzen sie antiproliferative Eigenschaften (Tantini, Manes et al. 2005).

SCG-Stimulatoren

Riociguat ist ein Stickstoffmonoxid-unabhängiger Stimulator der löslichen Guanylatzyklase (sGC), der die Bildung des cGMP fördert (Schermlay, Janssen et al. 2011). Im Rahmen einer Phase II-Studie mit PAH-Patienten zeigte sich bereits eine signifikante Verbesserung der Belastungskapazität und der hämodynamischen Parameter (Grimminger, Weimann et al. 2009). In weiteren Phase III-Studien wurde Riociguat erfolgreich bei CTEPH-Patienten (CHEST, CHronic-thromboEmbolic pulmonary Hypertension sGC-Stimulator Trial) als auch PAH-Patienten (PATENT, Pulmonary Arterial HyperTENSION sGC-Stimulator Trial) getestet (Ghofrani, D'Armini et al. 2013; Ghofrani, Galie et al. 2013) und erhielt kürzlich die EU-Zulassung für beide Formen der PH.

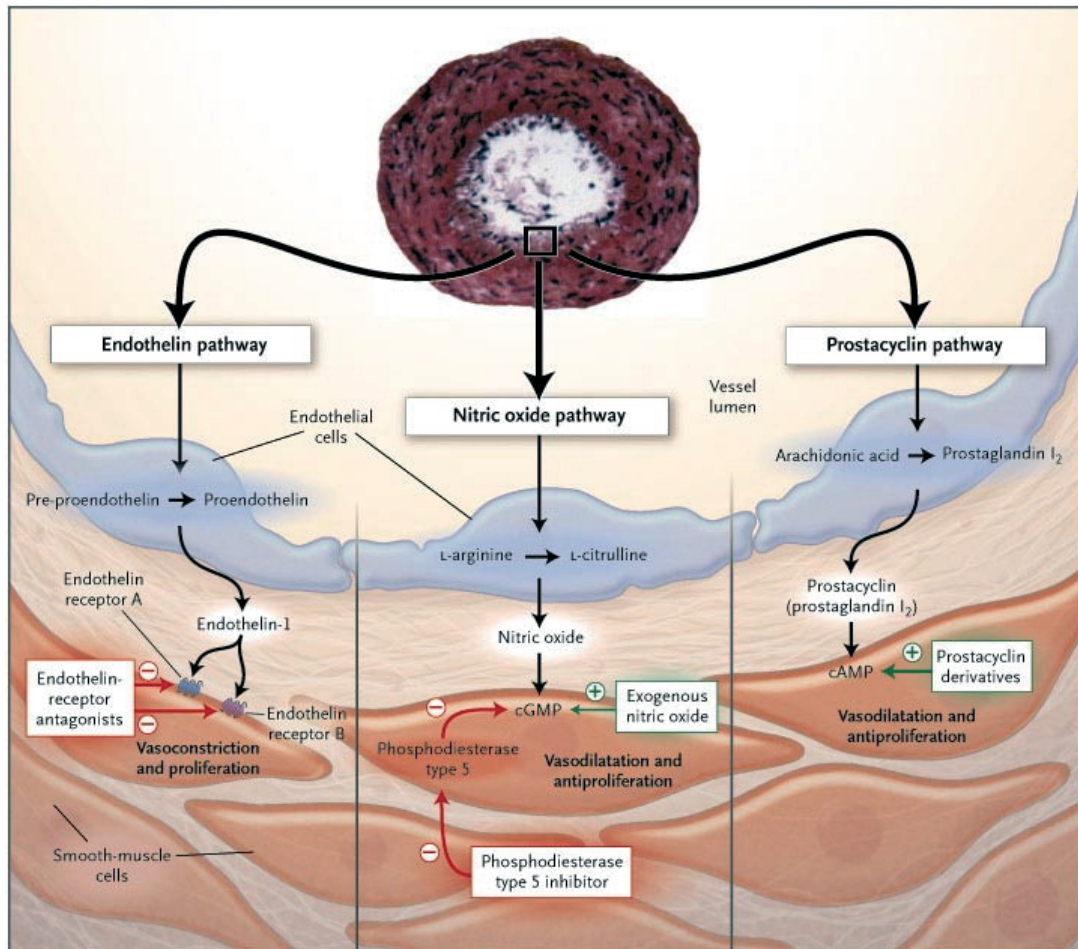


Abbildung 3: Molekulare Mechanismen der Pathogenese der pulmonalarteriellen Hypertonie und daraus abgeleitete therapeutische Angriffspunkte (Humbert, Sitbon et al. 2004)

Darüber hinaus sind weitere Medikamente zur Behandlung der PAH in Erprobung.

Serotonin-Rezeptor-Antagonisten

Das serotoninerge System ist bereits seit Langem im Fokus der Forschungen zur PAH. Serotonin gehört zu der Gruppe der Monoamine und kann über verschiedene Rezeptoren eine pulmonale Vasokonstriktion induzieren. Insbesondere der 5-HT_{2b}-Rezeptor ist bei der PAH vermehrt exprimiert, was unter anderem zu einer vermehrten Zellproliferation, Hyperplasie glattmuskulärer Zellen und Bildung von TGF- β führt (Herve, Launay et al. 1995; Eddahibi, Humbert et al. 2001). Des Weiteren konnte im Tiermodell eine dosisabhängige Verbesserung der Hämodynamik sowie eine verminderte Rechtsherzhypertrophie und Muskularisierung der pulmonalen Arterien unter Serotoninrezeptorantagonisten nachgewiesen werden (Guignabert, Raffestin et al. 2005). Derzeit werden die Effekte des 5-HT_{2a}- und 5-HT_{2b}-Antagonisten Terguride

im Rahmen einer klinischen Phase-II-Studie (TERPAH, Terguride für PAH) bei Patienten mit PAH untersucht.

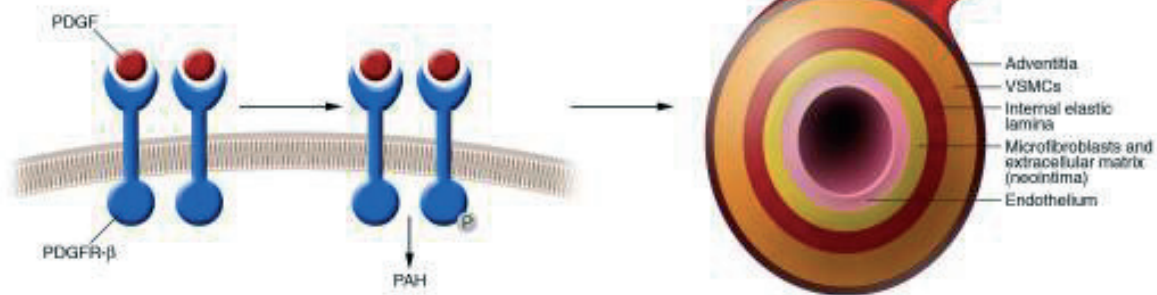
Imatinib

Imatinib wurde bereits in ersten klinischen Studien zur Behandlung der PH eingesetzt (Ghofrani, Seeger et al. 2005; Patterson, Weissmann et al. 2006; Souza, Sitbon et al. 2006). Imatinib blockiert die ATP-Bindungsachse von Rezeptortyrosinkinasen (BCR-ABL, c-kit und PDGFR) (Capdeville, Buchdunger et al. 2002) und findet bereits erfolgreich Anwendung in der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie (CML) sowie gastrointestinaler Stromatumoren (GISTs). Imatinib besitzt die Fähigkeit, die Proliferation und Migration glattmuskulärer Zellen, damit die pulmonalvaskulären Umbauprozesse zu inhibieren. Es wird daher angenommen, dass es PDGF-induzierte vaskuläre Umbauprozesse unterdrücken kann (Abbildung 4).

PDGF ist in der Lage, die Proliferation und Migration glattmuskulärer Zellen und Fibroblasten zu induzieren und wird daher als Schlüsselfaktor verschiedener Erkrankungen wie der Atherosklerose, der Lungenfibrose sowie auch der pulmonalen Hypertonie angenommen (Heldin and Westermark 1999; Reigstad, Varhaug et al. 2005; Schermuly, Dony et al. 2005). Den Nachweis einer erhöhten Expression von PDGF und PDGFR in Pulmonalarterien von Patienten mit pulmonalarterieller Hypertonie konnten Perros et al. erbringen (Perros, Montani et al. 2008).

Das PDGF-Signalsystem besteht aus vier Liganden, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D, die Homo- und Heterodimere ausbilden und über eine Bindung an die Rezeptortyrosinkinasen PDGFR- α und PDGFR- β wirken. Insbesondere PDGF-BB spielt als Mitogen für die pulmonalvaskulären Umbauprozesse bei der PH eine entscheidende Rolle (Ogawa, Nakamura et al. 2005; Sanchez, Marcos et al. 2007).

A Vascular remodeling in PAH



B STI571-induced reversal of pulmonary vascular remodeling

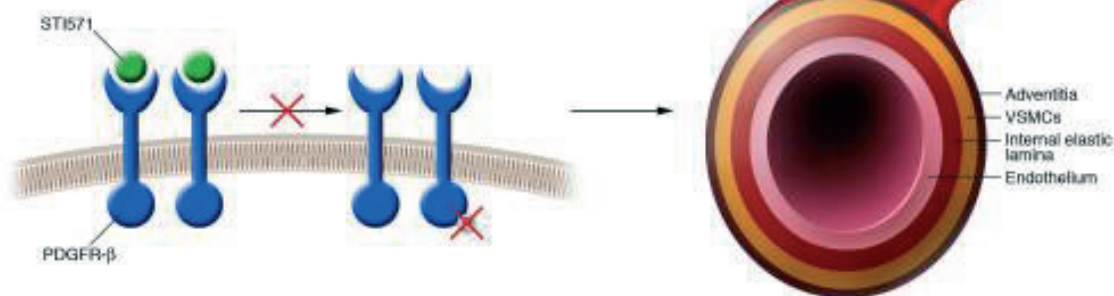


Abbildung 4: Schematische Darstellung der PDGF-bedingten Veränderungen in Pulmonalgefäßen bei der PAH.

(A) Die Expression von PDGF-Rezeptoren und deren Phosphorylation (P) in Pulmonalarterien sind bei der PAH erhöht und damit die Signalwege, die zu einer gesteigerten Proliferation von vaskulären glattmuskulären Zellen (VSMCs) und Ansammlung von Fibroblasten sowie extrazellulärer Matrix führen.

(B) Schermuli et al. konnten zeigen, dass die Blockierung der PDGF-Rezeptoren durch den Rezeptorantagonisten STI571 (Imatinib) ein reverses vaskuläres Remodeling induziert.

(Barst 2005; Schermuly, Dony et al. 2005)

Im Rahmen einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie haben Ghofrani et al. die Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit von Imatinib bei Patienten mit PAH und bestehender, etablierter Medikation untersucht (Ghofrani, Morrell et al. 2010). Zwar wurde ein primärer Endpunkt der Studie, die Verbesserung der 6-Minuten-Gehstrecke, nicht erreicht, jedoch konnte ein signifikanter Abfall des pulmonalvaskulären Widerstands und eine Erhöhung der kardialen Auswurfraction unter Imatinib festgestellt werden. Post-hoc-Analysen konnten zeigen, dass Patienten mit größeren hämodynamischen Einschränkungen besser auf eine Therapie mit Imatinib ansprechen als Patienten mit besseren hämodynamischen Werten.

Aufbauend auf diese Ergebnisse wurde die IMPRES-Studie (Imatinib in Pulmonary Arterial Hypertension, a Randomized Efficacy Study), ebenfalls eine doppelblinde, Placebo-kontrollierte und randomisierte Studie, initiiert. Evaluiert wurde Imatinib als

Ergänzungstherapie bei schwerer PAH (Hoeper, Barst et al. 2013). Hier konnte eine signifikante Verbesserung der Belastbarkeit und der hämodynamischen Parameter der PAH-Patienten unter Therapie mit Imatinib festgestellt werden. Allerdings wurden auch Abbrüche der Studienmedikation und schwerwiegende unerwünschte Ereignisse häufiger in der Imatinib-Gruppe beobachtet.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dieser Studien jedoch für eine gute Verträglichkeit von Imatinib und einen möglichen Einsatz als Ergänzungstherapie bei Patienten mit PAH.

Trotz inzwischen mehrerer verfügbarer Therapieoptionen gibt es bislang keine Möglichkeit einer Heilung der PAH (O'Callaghan, Savale et al. 2010).

Bei der CTEPH hingegen existiert als anerkannte potenziell kurative Therapie die pulmonale Endarteriektomie (PEA), bei der zentral bis segmental gelegene Thromben in einer offenen Operation herausgeschält werden. Die medikamentöse Vorbehandlung erfolgt hierbei in Analogie zur PAH-Therapie, wobei die Diagnostik und Durchführung der PEA nicht verzögert werden darf. In 20-40 % der Fälle ist die CTEPH inoperabel (Mayer 2010). Für eine PEA ist es erforderlich, den Patienten an eine Herz- Lungen-Maschine anzuschließen und in eine tiefe Hypothermie zu versetzen. Der fibrotisch umgebaute Thrombembolus wird aus der Pulmonalerterie bei komplettem Kreislaufstillstand herausgeschält, um Blutungen aus systemisch-pulmonalen Kollateralen zu vermeiden. Die perioperative Mortalität ist individuell einzuschätzen und liegt in erfahrenen Zentren bei etwa 5 % (Mayer 2010). Ein wichtiger Faktor ist die persistierende PH, die Jamieson et al. bei 77 % der verstorbenen Patienten festgestellt haben (Jamieson, Kapelanski et al. 2003). Insgesamt zeigt sich eine persistierende PH bei 10 - 20 % der Patienten (Bonderman, Jakowitsch et al. 2008).

Als *Ultima Ratio* ist bei medikamentös nicht zu stabilisierenden PAH-Patienten bzw. bei konservativ nicht zu stabilisierenden und nicht operablen CTEPH-Patienten eine Lungentransplantation zu erwägen.

1.2 Die Zellreihe der zirkulierenden Fibrozyten

1.2.1 Überblick über die Charakteristika zirkulierender Fibrozyten

Mit dem Begriff der zirkulierenden Fibrozyten definierten Bucala et al 1994 eine Zellreihe der Blutzirkulation, die sowohl Eigenschaften von Leukozyten als auch von Fibroblasten zeigt und an Wundheilungsprozessen beteiligt ist. Morphologisch ähneln sie Fibroblasten durch ihr spindelförmiges Aussehen und die Produktion extrazellulärer Matrixproteine (Bucala, Spiegel et al. 1994). Fibrozyten exprimieren den hämatopoetischen Stammzellmarker CD34, den Pan-Leukozytenmarker CD45 und verschiedene Monozytenmarker sowie Vimentin, Kollagen I und III, Prokollagen, Prolyl-4-Hydroxylase und α -SMA (Tabelle 4).

Ihr Ursprung aus dem Knochenmark konnte am Tiermodell bewiesen werden (Hashimoto, Jin et al. 2004; Mori, Bellini et al. 2005).

Anfänglich ging man davon aus, dass Fibrozyten ca. 0,1 - 0,5 % der zirkulierenden Population nicht-erythrozytärer Zellen ausmachen. In weiterführenden Experimenten wurde jedoch deutlich, dass Fibrozyten von zirkulierenden Vorläuferzellen abstammen und als solche nicht im Blut vorhanden sind (Abe, Donnelly et al. 2001; Pilling, Buckley et al. 2003). Es ist davon auszugehen dass Fibrozyten sich aus einer Subpopulation von CD14⁺ mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) ableiten (Abe, Donnelly et al. 2001; Pilling, Buckley et al. 2003). Diese exprimieren den IgG-Rezeptor Fc γ RI (CD64) und Fc γ II (CD32), nicht aber den niedrigaffinen IgG-Rezeptor Fc γ III (CD16) (Pilling, Buckley et al. 2003; Pilling, Tucker et al. 2006). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass es sich bei den Vorläuferzellen der Fibrozyten um eine kleine Gruppe CD14⁺ CD16⁻ Monozyten handelt, die den CC Chemokinrezeptor 2 (CCR2) exprimieren und im Zusammenhang mit Entzündungen auftreten (Gordon and Taylor 2005; Tacke and Randolph 2006). Reifen die Vorläuferzellen zu Fibrozyten, kommt es zu einer Herunterregulierung der Expression von CCR2 und CD14.

Die Rekrutierung von Fibrozyten aus dem Blut wird über Chemokinrezeptoren an deren Zelloberfläche gesteuert, wobei CCR7, Rezeptor für CCL21, und CXCR4, Rezeptor für CXCL12, eine besondere Bedeutung zukommt (Abe, Donnelly et al. 2001; Phillips, Burdick et al. 2004).

Die Hypothese, dass Fibrozyten von mononukleären Vorläuferzellen abstammen wird gestützt durch ihre Expression von Oberflächenproteinen, die zur Antigenpräsentation benötigt werden. Dazu gehören der Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) und die kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86, die die Fähigkeit besitzen, naive T-Zellen zu aktivieren (Chesney, Bacher et al. 1997).

Markers	Function	Other cell types
α -Smooth muscle actin	Contractile element	Myofibroblasts
Vimentin	Intermediate filament	Fibroblasts
Fibronectin	Pericellular matrix	Mesenchymal cells
Collagens I and III	Extracellular matrix	Fibroblasts, smooth muscle, connective tissue
Type I procollagen	Secreted unprocessed precursor of collagen I	Fibroblasts
Prolyl 4-hydroxylase	Collagen hydroxylation	Fibroblasts
CD11a (LFA-1)	α L subunit of integrin LFA-1, adhesion molecule	Lymphocytes, granulocytes, monocytes, granulocytes
CD11b (MAC-1)	α M subunit of integrin CR3, adhesion molecule	Monocytes, granulocytes, NK cells
CD13 (aminopeptidase N)	Pan-myeloid antigen	Myelomonocytic cells
CD18	β 2 integrin	Myeloid and DC
CD34	Hematopoietic stem cell, capillary endothelial marker	Hematopoietic progenitors, embryonic fibroblasts
CD45RO	Leukocyte common antigen	Leukocytes
CD54 (ICAM-1)	Intracellular adhesion molecule binds LFA-1 and Mac-1	Hematopoietic and non-hematopoietic cells
CD58 (LFA-3)	Adhesion molecule, binds CD2	Hematopoietic and non-hematopoietic cells
CD71	Transferrin receptor	Macrophages, activated cells
CD80 (B7.1)	Co-stimulatory molecule binds CD28	Antigen presenting cells
CD86 (B7.2)	Co-stimulatory molecule binds CD28	Antigen presenting cells
MHC II DP, DQ, DR	Major histocompatibility molecule for antigen presentation	Antigen presenting cells
CXCR4 (CD184)	Receptor for stromal derived cell factor (SDF)	Immature CD34+ hematopoietic cells
CCR3	Receptor for secondary lymphoid chemokine (SLC)	Lymphocytes
CCR5 (CD195)	Receptor for a CC type cytokine	Promyelocytic cells
CCR7 (CDw197)	Mediates lymphocyte function, receptor for MIP-3 β	Activated lymphocytes

Tabelle 4: Oberflächenmarker zirkulierender Fibrozyten (Quan, Cowper et al. 2004)

Die Differenzierung von CD14⁺ Vorläuferzellen zu Fibrozyten ist ein dynamischer Prozess und wird durch eine ganze Reihe löslicher und zellbasierter Mediatoren geregelt. Im Zellkulturmodell erwies sich der direkte Kontakt der Vorläuferzellen zu T-Lymphozyten als fördernd, wie auch die Stimulation durch TGF- β (transforming growth factor β) (Abe, Donnelly et al. 2001; Yang, Scott et al. 2002). Als wesentlicher Faktor zur Hemmung der Fibrozytendifferenzierung konnte Amyloid P (SAP) identifiziert werden (Pilling, Buckley et al. 2003).

Als ausreichendes Kriterium zur Identifizierung von Fibrozyten *in vitro* als auch *in vivo* gilt der Nachweis der Kollagenproduktion und die Expression von CD34 oder CD45 an ihrer Oberfläche (Moeller, Gilpin et al. 2009)

Fibrozyten produzieren und sezernieren unterschiedliche Faktoren, die für die Wundheilung und bei fibrotischen Umbauprozessen eine Rolle spielen. Dazu gehören proinflammatorische Zytokine (TNF, IL-6, IL-8, IL-10 und MIP-1 α/β) sowie angiogene Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) und PDGF (platelet derived growth factor).

Es wurde postuliert, dass kontraktile Myofibroblasten den ultimativen Phänotyp der Fibrozyten darstellen. Diese Idee beruht auf der Erkenntnis, dass Fibrozyten *in vitro* auf TGF- β 1 mit der Expression von α -SMA reagieren (Abe, Donnelly et al. 2001; Phillips, Burdick et al. 2004). Die Expression von α -SMA tritt hierbei zeitverzögert auf und geht

einher mit dem Verlust von CD34 (Schmidt, Sun et al. 2003; Phillips, Burdick et al. 2004; Quan, Cowper et al. 2004).

Fibrocyte Differentiation, Recruitment, and Function

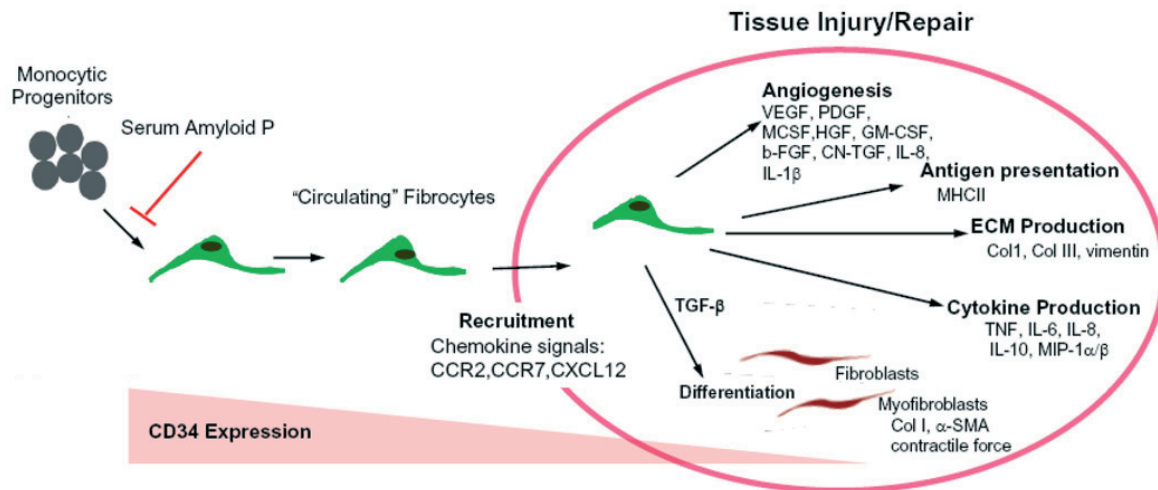


Abbildung 5: Übersicht über die Differenzierung, Rekrutierung und Funktion von Fibrozyten

Fibrozyten stammen von CD14⁺ Vorläuferzellen ab und werden entlang von Chemokingradienten an den Ort von Gewebeschäden und Entzündungen rekrutiert. Die Expression des Oberflächenmarkers CD34 nimmt mit der Invasion in betroffenes Gewebe und weiterer Differenzierung ab. Nach Herzog et al. (Herzog and Bucala 2010). α -SMA = α -smooth muscle actin; b-FGF = basic fibroblast growth factor; GM-CSF = granulocyte-macrophage-colony stimulating factor; HGF = hepatocyte growth factor; IL = interleukin; MCSF = macrophage-colony stimulating factor; MHCII = Major histocompatibility complex class II; MIP-1 = macrophage inflammatory protein -1; PDGF = platelet-derived growth factor; TGF = transforming growth factor; TNF = tumor necrosis factor; VEGF = vascular endothelial growth factor.

1.2.2 Die Rolle zirkulierender Fibrozyten in Krankheitsprozessen

Die Biologie der Fibrozyten ist komplex und bislang nicht hinreichend aufgeklärt. Durch die Produktion von Zytokinen, extrazellulären Matrixproteinen, Wachstumsfaktoren und durch die Unterstützung der Angiogenese nehmen Fibrozyten Einfluss auf die physiologische Wundheilung (Mori, Bellini et al. 2005; Ishida, Kimura et al. 2009). Bereits 1994 konnten Bucala, Spiegel et al. mittels eines *in vivo* Wundkammer-Modells in Mäusen die Rekrutierung von CD34⁺, Vimentin⁺ und Kollagen I⁺ Zellen während der inflammatorischen Phase der Wundheilung feststellen (Bucala, Spiegel et al. 1994). Abe et al. konnten nachweisen, dass die Rekrutierung der Fibrozyten in die Haut von

Mäusen *in vivo* abhängig von CCL21 verläuft, dessen Rezeptor CCR7 an der Fibrozytenoberfläche exprimiert wird (Abe, Donnelly et al. 2001).

Darüber hinaus sprechen zahlreiche Indizien auch für eine Beteiligung von Fibrozyten an anormaler Wundheilung mit Narbenbildung sowie verschiedenen weiteren Erkrankungen.

Hypertrophe Narbenbildung und Keloide

Yang et al. gelang der Nachweis vermehrter Fibrozyten im hypertrophen Narbengewebe nach Brandverletzungen der Haut (Yang, Scott et al. 2005). Hypertrophe Narben und Keloide repräsentieren zwei unterschiedliche Formen der anormalen Wundheilung. Das Keloid wächst im Gegensatz zur hypertrophen Narbe über die ursprünglichen Wundgrenzen hinaus und infiltrierte in das umgebende gesunde Gewebe. Aiba und Tagami konnten bereits 1997 spindelförmige Zellen in hypertrophen Narben bzw. Keloiden nachweisen, die sowohl CD34 als auch Prolyl 4-Hydroxylase, das an der Kollagensynthese beteiligt ist, exprimieren. Dabei wurde eine inverse Korrelation zwischen der Expression von CD34 und der Produktion von Prolyl 4-Hydroxylase beobachtet (Aiba and Tagami 1997).

Nierenfibrose

Die Beteiligung zirkulierender Fibrozyten an den fibrotischen Umbauvorgängen der Niere konnte die Arbeitsgruppe um Wada et al. demonstrieren. Sie beobachteten die Rekrutierung von Fibrozyten, in Abhängigkeit von CCL21, und konnten über die Blockierung der CCL21-CCR7-Achse einen Rückgang der interstitiellen Nierenfibrose am Mausmodell nachweisen (Wada, Sakai et al. 2007).

Nephrogene systemische Fibrose

Galan et al. untersuchten die Beteiligung von Fibrozyten bei der nephrogenen systemischen Fibrose (Galan, Cowper et al. 2006). Diese Erkrankung ist gekennzeichnet durch fortschreitende Fibrosierungen der Haut, Muskulatur und innerer Organe wie Leber, Herz, Lungen und Zwerchfell. Ursächlich hierfür ist die Gabe von Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln bei Patienten mit stark eingeschränkter Nierenfunktion im Rahmen einer Magnetresonanztomographie (MRT). Es kommt hierbei zu Ablagerungen von Gadolinium im Gewebe, die die Fibrosierungsprozesse auslösen (Grobner 2006). Vakil et al. konnten *in vitro* nachweisen, dass Gadolinium endogene Faktoren wie SAP und IL-12 inhibiert und somit die Differenzierung von Fibrozyten fördert (Vakil, Sung et al. 2009).

Sklerodermie

Auch bei der Sklerodermie gibt es Hinweise für ein Mitwirken von Fibrozyten. Es handelt sich um eine Autoimmunerkrankung, die dem Formenkreis der Kollagenosen zugerechnet wird und mit fortschreitenden Fibrosierungen der Dermis und innerer Organe einhergeht. Die Ursache für die zugrunde liegende Überproduktion von Kollagen ist bislang nicht abschließend geklärt, wobei inflammatorische Prozesse eine Rolle spielen könnten. In Hautbiopsien von Sklerodermiepatienten waren keine vermehrten CD34⁺ und Prolyl 4-Hydroxylase⁺ Fibrozyten nachweisbar (Cowper, Bucala et al. 2005). Auch durchflusszytometrisch zeigten sich keine erhöhten Werte (Russo, Medbury et al. 2007). Im Blut von Sklerodermie-Patienten mit Lungenbeteiligung konnten Mathai et al. jedoch eine erhöhte Konzentration zirkulierender Fibrozyten feststellen, die mit einer vermehrten Produktion von MCP-1 einherzugehen schien (Mathai, Gulati et al. 2010).

Fibrosierende Lungenerkrankungen

Zur Rolle zirkulierender Fibrozyten bei fibrosierenden Lungenerkrankungen liegen bereits mehrere Arbeiten vor. In einem *in vitro* Mausmodell bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose konnten Phillips et al. eine erhöhte CXCL12 Expression in der Lunge sowie eine vermehrte Fibrozytenzahl im Vergleich zu Kontrolltieren feststellen. Die Blockierung der CXCL12-CXCR4 Achse mittels spezifischer CXCL12-Antikörper führte zu einer signifikanten Reduzierung der Rekrutierung von Fibrozyten (CD45⁺, Col⁺, CXCR⁺) im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der unspezifische Antikörper verwendet wurden. Korrespondierend wurde eine verminderte Kollagenproduktion und ein Rückgang der α -SMA⁺ Zellen in den Mäuselungen beobachtet (Phillips, Burdick et al. 2004).

Mehrad et al. konnten eine vermehrte Expression von CXCL12 in den Lungen und im Plasma von Patienten mit interstitieller Lungenfibrose nachweisen. Untersucht wurde Lungengewebe und peripheres Blut von Patienten mit gewöhnlicher interstitieller Pneumonie (UIP) und nichtspezifischer interstitieller Pneumonie (NSIP). Die erhöhten CXCL12-Konzentrationen waren assoziiert mit einer erhöhten Anzahl von Fibrozyten im peripheren Blut (Mehrad, Burdick et al. 2007).

In einer weiteren Studie untersuchten Moeller et al. Blut von Patienten mit der Diagnose einer idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) und konnten ebenfalls eine erhöhte Anzahl CD45⁺ und Col1⁺ Fibrozyten nachweisen, die jedoch nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierte. Allerdings sprachen hohe prozentuale Anteile

von Fibrozyten für eine schlechte Prognose der Erkrankung (Moeller, Gilpin et al. 2009).

Asthma bronchiale

Ferner gibt es Hinweise für eine Beteiligung zirkulierender Fibrozyten an der Pathogenese des Asthma bronchiale. Lungen von Patienten mit chronischem Asthma bronchiale sind gekennzeichnet durch ein persistierendes Entzündungsinfiltrat und durch eine Atemwegsobstruktion. Histomorphologisch zeigt sich ein Remodeling der Atemwege mit subepithelialen Fibrosierungen und Ansammlungen von Myofibroblasten.

Als erstes gelang Schmidt et al. 2003 der Nachweis von Fibrozyten (CD34⁺, Prokollagen Ia⁺) in den Atemwegen von Asthmapatienten. Zudem konnte eine Vermehrung der Fibrozytenzahl nach Allergenexposition belegt werden (Schmidt, Sun et al. 2003). Die Rekrutierung von Fibrozyten aus dem peripherem Blut in das bronchiale Mukosagewebe und die Differenzierung zu Myofibroblasten wurde in einer ergänzenden Studie am Mausmodell dargelegt (Schmidt, Sun et al. 2003). In nachfolgenden Untersuchungen konnten CD34⁺, CD45⁺, α -SMA⁺ Zellen in der Bronchiallavageflüssigkeit von Asthmapatienten identifiziert werden, deren Präsenz mit der Dicke der Basalmembran der Atemwege korrelierte (Nihlberg, Larsen et al. 2006). Lungenfunktionell konnte die Arbeitsgruppe um Wang et al. einen Zusammenhang zwischen der Einsekundenkapazität (FEV1), als Grad der Atemwegsobstruktion, und der Anzahl zirkulierender Fibrozyten herstellen. Eine erhöhte Zahl zirkulierender Fibrozyten in Kultur korrelierte mit einer verminderten FEV1 (Wang, Huang et al. 2008).

1.2.2 Einfluss der zirkulierenden Fibrozyten auf das pulmonalvaskuläre Remodeling

In der letzten Dekade rückten Fibrozyten, nicht zuletzt aufgrund ihrer Möglichkeit zu Myofibroblasten zu differenzieren, immer weiter in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen zu pulmonalvaskulären Umbauprozessen.

Die Beteiligung von Fibrozyten am pulmonalvaskulären Remodeling konnten Frid et al. 2006 in einer Studie mit neugeborenen Kälbern und am Rattenmodell mit chronischer, Hypoxie-induzierter PH dokumentieren. Nachweisbar war eine starke perivaskuläre Ansammlung mononukleärer Zellen aus der Monozyten-/Makrophagen-Linie, einschließlich Fibrozyten (CD45⁺, Col⁺). Dem Remodeling der pulmonalarteriellen

Adventitia konnte *in vivo* in chronisch hypoxischen Ratten durch spezifische Depletion der Monozyten vorgebeugt werden (Frid, Brunetti et al. 2006).

In nachfolgenden Untersuchungen konnte ebenfalls am Rattenmodell gezeigt werden, dass anhaltende Hypoxie zu einer komplexen Pulmonalarterien-spezifischen proinflammatorischen Umgebung führt, die die Rekrutierung, Akkumulation und Differenzierung von zirkulierenden Fibrozyten im Lungenkreislauf fördert (Burke, Frid et al. 2009).

2010 bewiesen Nikam et al. am Mausmodell die Präsenz von Fibrozyten (CD45⁺, Col I⁺) in Pulmonalgefäßen (Nikam, Schermuly et al. 2010). Anhand einer quantitativen mRNA-Expressionsanalyse konnten sie in ihrer Arbeit zudem einen signifikanten Anstieg der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 bei Hypoxie-induzierter PAH demonstrieren. Der Einfluss der CXCL12-CXCR4-Achse bei Hypoxie-induzierter PAH wurde 2009 auch von Young et al. untersucht. Sie konnten zeigen, dass eine Blockade der CXCL12-CXCR4-Achse den Hypoxie-induzierten pulmonalvaskulären Umbau bei neugeborenen Mäusen verhindert und den pulmonalarteriellen Druck bei neugeborenen Mäusen mit etablierter PAH signifikant senkt (Young, Torres et al. 2009).

Des Weiteren untersuchten Nikam et al. Lungengewebe von transplantierten PAH-Patienten und fanden hier lediglich wenige Zellen, die in den immunhistochemischen Untersuchungen eine Positivität für CD45 und Kollagen I zeigten. Als mögliche Erklärungen wurde eine vorangegangene langjährige intravenöse Prostazyklin-Therapie angenommen. Darüber hinaus wurde eine Abnahme der Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten im Endstadium der Erkrankung diskutiert oder aber die Möglichkeit einer raschen Differenzierung mit dem Verlust hämatopoetischer Marker (Nikam, Schermuly et al. 2010).

Bei Patienten mit CTEPH konnten Yao et al. aus dem Knochenmark stammende endotheliale Vorläuferzellen sowohl am entfernten Thrombus (CD34⁺, VEGFR⁺), als auch am proximalen Anteil der betroffenen Pulmonalarterienwand (CD45⁺, Prokollagen I⁺) demonstrieren. In ergänzenden Untersuchungen wurde der Einfluss multipotenter mesenchymaler Vorläuferzellen in der CTEPH näher beleuchtet. Die aus dem Thrombusgewebe mittels Zellkultur gewonnenen Zellen waren positiv für α -SMA und Vimentin. In der FACS-Analyse waren die Zellen des Thrombusgewebes jedoch negativ für CD34 und CD45 (Yao, Firth et al. 2009).

2 Fragestellung

Die IPAH als auch die CTEPH sind lebensbedrohliche Erkrankungen, deren Pathogenese jeweils nicht vollständig beschrieben ist. Beide Krankheitsbilder weisen pathomorphologische Parallelen auf.

Mit dieser Arbeit soll der mögliche Einfluss zirkulierender Fibrozyten bei der Pathogenese beider Formen der PH untersucht und vergleichend eventuelle Übereinstimmungen bzw. Unterschiede herausgestellt werden.

Dazu wird eine quantitative Bestimmung von zirkulierenden Fibrozyten aus dem peripheren Blut von IPAH- und CTEPH-Patienten sowie der Kontrollgruppe gesunder Probanden durchgeführt.

Ergänzend soll in vitro mittels MTT Test die Viabilität der Zellen ermittelt werden.

Mittels ELISA wird die Konzentration des Faktors PDGF-BB sowie der Chemokinliganden CCL21 und CXCL12 im peripheren Blut der beiden Patientengruppen bzw. der Kontrollgruppe bestimmt.

Schließlich soll am Paraffinmaterial transplanteder Lungen von IPAH- bzw. CTEPH-Patienten der immunhistochemische Nachweis von Fibrozyten in Pulmonalarterien erbracht werden.

3 Material

3.1 Zellisolierung und Immunfluoreszenzfärbungen

3.1.1 Zellkulturmaterial

- 12-Kammer-Platten, Greiner Bio-One, Deutschland
- Aceton, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Automatisiertes Rotationsmicrotom RM 2165, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
- Blutröhrchen, EDTA, 7,5ml, Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
- BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Cell Scraper, CORNING, Schiphol-Rijk, Holland
- Deckgläser, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Deckglas-Pinzette, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Dulbecco`s modified eagle`s medium (DMEM), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Dulbecco`s phosphate buffered saline (DPBS), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Ethanol (70%, 96%, 99,6%), Fischer, Saarbrücken, Deutschland
- Fetales Kälberserum (FCS), PROMO CELL, Heidelberg, Deutschland
- Fettstift, DAKO, Glostrup, Dänemark
- Ficoll Dichtegradient Lösung, AG Biochrome, Deutschland
- Fluorescent Mounting Medium, DAKO, Glostrup, Dänemark
- Fluoreszenzmikroskop Leica DMR, Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland
- Heizplatte, Leica HI 1220, Wetzlar, Deutschland
- Inverses Mikroskop Wilovert, HUND, Wetzlar, Deutschland
- Konfokalmikroskop, Leica, Wetzlar, Deutschland
- Kühlplatte, Leica EG 1150 C, Wetzlar, Deutschland
- L-Glutamin, PAN BIOTECH, Sydney, Australien
- Menzel-Gläser Superfrost, ultra plus, Braunschweig, Deutschland
- Methanol, Roth, Karlsruhe Deutschland
- Nagellack, Nivea, Hamburg, Deutschland
- Neubauerzählkammer, Marienfeld, Deutschland
- Objekträger, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin, PAN BIOTECH, Sydney, Australien
- Rotihistol, Roht, Karlsruhe, Deutschland

- Serologische Pipette, steril, mit Spitze, 10 ml, FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Serologische Pipette, steril, mit Spitze, 5 ml, FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Serologische Pipette, steril, mit Spitze, 50 ml, FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Skalpell, Feather, Japan
- Sterilbank, NuAire, Plymouth, USA
- Triton X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Trypsin, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA
- Vakuumpumpe, KNF Lab, Freiburg, Deutschland
- Wärmebad, Microm SB 80, Walldorf, Deutschland
- Zellinkubator, NuAire, Plymouth, USA
- Zellkulturschrank Hera Cell, HERAEUS, Hanau, Deutschland
- Ziegenserum, Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland

3.1.2 Antikörper

Antikörper	Spezies	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Primär - Antikörper				
Anti-Fibroblast [5B5]	Maus	h	1:100	DAKO, Glostrup, Dänemark
Vimentin; Cy3 konjugiert [V9]	Maus	h	1:400	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kollagen I	Kaninchen	h, m, r	1:100	Biodesign, Quakertown, USA
Sekundär Antikörper				
Alexa 555	Ziege	r	1:1000	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa 488	Ziege	m	1:1000	Molecular Probes, Eugene, USA

Tabelle 5: Antikörper Fibrozytenfärbung

3.1.3 Farbstoffe

- HOECHST 33342 Kernfarbstoff, HOECHST, Frankfurt, Deutschland
- TO-PRO®-3 Iodide Kernfarbstoff, Molecular Probes, Eugene, USA

3.2 ELISA

- Antikoagulant
 - 15 mmol/l Theophyllin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 - 3,7 mmol/l Adenosin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 - 0,198 mmol/l Dipyridamol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 - 0.11 mol/l NaCl
 - Aqua dest.
- Blutröhrchen, Citrat, 3,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
- ELISA Reader, Nanoquant Tecan, Männerdorf, Schweiz
- Human CCL21 Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA
- Human CXCL12 Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA
- Human PDGF-BB Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA
- Orbital Microplate Shaker, IKA, Staufen, Deutschland

3.3 MTT Test

- 96-Kammer-Platten, Greiner Bio-One, Deutschland
- DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Microplate Reader MR 5000, Dynatech, Dynex, Denkendorf, Deutschland
- MTT, Molecular Probes, Eugene, USA

3.4 Sonstige Materialien

- Butterfly, Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
- Einkanalpipette, 0,5-10 µl, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Einkanalpipette, 100-1000 µl, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Einkanalpipette, 10-100 µl, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Konisches Röhrchen, Polypropylen, steril, 15 ml FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Konisches Röhrchen, Polypropylen, steril, 50 ml FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- MS1 Minishaker, IKA, Staufen, Deutschland
- Pipettenspitze, blau, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitze, gelb, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitze, weiß, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Safe-Lock Gefäße, 2,0 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge Micro 22R, HETTICH, Tuttlingen, Deutschland

-
- Zentrifuge Rotina 46R, HETTICH, Tuttlingen, Deutschland

3.5 Lösungen und Puffer

PBS 10x (PH=7,4, eingestellt mit HCl/NaOH nach Lösung der Salze)

80 g NaCl

2 g KCl

11,5 g Na₂HPO₄·2H₂O

2 g KH₂PO₄

mit Aqua dest. auf 1 L.

PBS 1x

100 ml 10 x PBS

mit Aqua dest. auf 1 L.

Histopuffer

3 % BSA

0,2 % Triton X-100

1x PBS

EDTA 0,5M (pH=8, eingestellt mit HCl/NaOH nach Lösung der Salze)

14,61 g EDTA

Mit Aqua dest. Auf 0,1 L.

4 Methoden

4.1 Patientenkollektiv/Probanden

Die untersuchten Gruppen setzten sich zusammen aus Patienten mit der Diagnose einer IPAH bzw. einer CTEPH. Die gesunde Kontrollgruppe bestand aus freiwilligen Probanden.

4.1.1 Ein – und Ausschlusskriterien

4.1.1.1 Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Patienten, deren Diagnose einer IPAH bzw. CTEPH leitliniengerecht u.a. durch radiologische Untersuchungsverfahren und eine invasive hämodynamische Charakterisierung mittels Rechtsherzkatheter verifiziert wurde. Ferner wurde das Blut klinisch gesunder Patienten untersucht.

4.1.1.2 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden Patienten deren PH durch eine Linksherzerkrankung bzw. eine Lungenerkrankung und/oder Hypoxie-bedingt war. Ebenfalls nicht berücksichtigt wurden Patienten mit einer PH mit unklarem bzw. multifaktoriellen Mechanismus. Bezüglich der Kontrollgruppe durften keinerlei chronische oder akute Erkrankungen im Sinne von Stoffwechselerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Infektionen, Verletzungen o.ä. bestehen.

4.1.2 Einverständniserklärung

Die Patienten wurden über die geplanten Untersuchungen und die Weiterverarbeitung der gewonnenen Proben aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis hierzu. Für die Studie lag ein positives Votum der Ethikkommission am Fachbereich Humanmedizin des Universitätsklinikums Gießen vor.

4.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Die zirkulierenden Fibrozyten wurden aus 14,0 - 15,0 ml peripherem venösen Blut von Patienten bzw. Probanden isoliert. Um einer Blutgerinnung entgegenzuwirken, wurden die verwendeten EDTA-Entnahmeröhrchen nach der Blutentnahme sorgfältig geschwenkt.

Das EDTA-Blut wurde in 50 ml Falcon tubes überführt und auf 25 ml mit DMEM (low glucose) aufgefüllt. Anschließend wurde das entstandene Gemisch auf 12 ml Ficoll geschichtet und über 20 min. ohne Bremse zentrifugiert (1800 rpm).

Das Ficoll fungiert hierbei als Dichtegradient und führt zur Bildung von Schichten verschiedener Zelltypen (Abbildung 6).

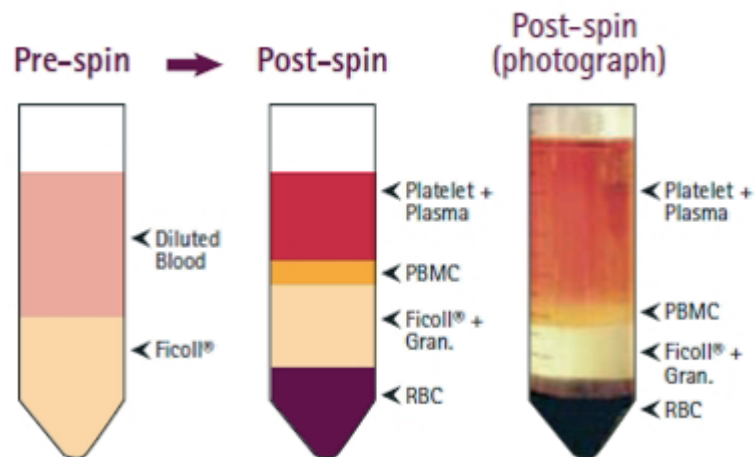


Abbildung 6: Darstellung der Isolation von PBMC aus Vollblut

Vor der Zentrifugation wurde das Blut-DMEM-Gemisch in 50 ml Falcon tubes auf Ficoll geschichtet. Durch die Zentrifugation über dem Ficoll-Dichtegradienten bildeten sich Schichten verschiedener Zelltypen. Die oberste Schicht wurde gebildet aus Thrombozyten (Platelets) und Plasma. Die angrenzende Schicht bestand aus PBMCs. Darunter lag das Gemisch aus Ficoll und Granulozyten. Die unterste Schicht beinhaltete rote Blutzellen (RBC).
(images.frompo.com)

Die Schicht aus PBMCs (peripheral blood monocytes) wurde vorsichtig abgesaugt, mit 5 ml DMEM aufgefüllt und für 10 min bei 1800 rpm zentrifugiert. Von dem so entstandenen Pellet aus PBMCs wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet darauf mit 1 ml Kulturmedium (DMEM, 20 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin) resuspendiert.

Die Zellzahl wurde anschließend mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Umgerechnet 5×10^6 Zellen wurden jeweils in eine Kammer der 12-Kammer-Platten transferiert, mit 2 ml Kulturmedium aufgefüllt und bei 37 ° C im Inkubator gelagert.

Nach fünf Tagen in Kultur wurden die nicht adhärennten Zellen mit dem Kulturmedium vorsichtig abgesaugt. Die adhärennten Zellen wurden im Folgenden in der Neubauer-Zählkammer quantifiziert, immunhistochemisch markiert und im MTT Test weiter untersucht. Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur unter der Sterilbank.

4.3 Quantitative Untersuchung der adhärenenten Zellen

Die am Boden der Zellkammern adhärenenten Zellen wurden nach fünf Tagen in Kultur zunächst zweimal mit DPBS gewaschen und für 10 min. mit 100 µl Trypsin für bei 37 ° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit einem *Cell scraper* abgestreift und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Um alle Zellen zu erfassen wurden die Zellkammern noch zweimal mit Kulturmedium ausgespült. Das Gemisch wurde darauf für 10 min. bei 1800 rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert.

Die Anzahl der adhärenenten Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt.

4.4 Immunfluoreszenzfärbung der Zellkammern

In die für die Immunfluoreszenzfärbung vorgesehenen Zellkammern wurden vor Einbringung der Zellen je ein mit Methanol vorbehandeltes Deckglas eingesetzt. Nach der Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die Zellkammern zunächst wiederholt mit PBS gewaschen. Ebenso wurde jeder der nachfolgenden Schritte durch gründliches Waschen mit PBS abgeschlossen.

Die Zellen wurden mit einem auf -20 ° C abgekühlten Aceton-Methanol-Gemisch, im Verhältnis 1:1, für 7 min. bei Raumtemperatur fixiert. Mit einem 3%-BSA-Ziegenserum-Gemisch wurden anschließend für 60 min. unspezifische Bindungsstellen geblockt.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 60 min. bei Raumtemperatur. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde im Dunkeln für ebenfalls 60 min. inkubiert.

Die Zellkerne wurden mittels HOECHST 33342-Färbung (10 min.) dargestellt. Das Deckglas mit den gefärbten adhärenenten Zellen wurde zuletzt aus der Zellkammer entnommen, mit Mowiol auf einen Objektträger aufgebracht und randlich mit Klarlack versiegelt. Anschließend wurde das Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 20facher Vergrößerung untersucht.

4.5 MTT Test

Mittels MTT-Test wurde die Zellviabilität der kultivierten adhärenenten Zellen bestimmt. Das Verfahren beruht auf der enzymatischen Reduktion des löslichen gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid)

zu blau-violetten, unlöslichem Formazan. Die Formazanmenge wird fotometrisch quantifiziert.

In die Zellkammern mit den adhären Zellen wurde nach Absaugen des Kulturmediums mit den freien Zellen 1 ml frisches Medium gegeben. Hinzugefügt wurden 50 µl der MTT-Stammlösung, bestehend aus 5 mg MTT und 1 ml PBS. Nach anschließender vierstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Medium-MTT-Gemisch entfernt und die Zellen mit 200 µl DMSO lysiert. Diese Lösung wurde vorsichtig durchmischt bis sich die Kristalle lösten. Jeweils 50 µl der Lösung wurden in zwei Kammern einer 96-Kammer-Platte überführt und die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 550 nm als Testfilter und 650 nm als Referenzfilter im Microplate Reader bestimmt. Die beiden gemessenen Werte wurden anschließend gemittelt. Als Kontrolle diente MTT-Stammlösung.

4.6 ELISA

Die Proteinkonzentrationen von CCL21, CXCL12 und PDGF-BB wurde in plättchenarmen Plasma (PPP) gemessen.

Hierzu wurde zwischen 3,0 ml und 3,5 ml peripheres Blut in Citrat-Blutentnahmeröhrchen abgenommen. Das Vollblut wurde anschließend in vorgekühlte 15 ml Falcon tubes mit 170 µl Antikoagulant, bestehend aus Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol, NaCl und Aqua dest. transferiert. Das entstandene Gemisch wurde unmittelbar darauf bei 4° C und 1200 g für 15 min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Plasmaüberstand abpipettiert und erneut bei 4 °C und 3500 g zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand entfernt und das so gewonnene PPP bis zur weiteren Analyse bei -80° C gelagert. Zwischen Blutentnahme und der ersten Zentrifugation vergingen maximal 30 min.

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinen im Plasma wurde die Sandwich-ELISA-Technik (enzyme-linked immuno sorbent assay) genutzt. Hierbei werden bereits mit einem Antikörper beschichtete Mikrotiterplatten verwendet. Nach Zugabe der Probe bindet das zu identifizierende Antigen an den spezifischen Antikörper. Im nächsten Schritt wird das nicht fixierte Material entfernt, der Versuchsansatz gewaschen und ein zweiter Antikörper mit derselben Spezifität hinzugegeben, der an ein Enzym gekoppelt ist. Nach einem weiteren Waschschrift wird ein Farbsubstrat zugefügt, das durch das gebundene Enzym aktiviert wird. Die Enzymaktivität kann so fotometrisch erfasst werden. Sie ist proportional zur Menge des gebundenen Zielmoleküls.

Zur Quantifizierung werden die Messwerte mit einer Standardkurve aus Proben von mitgeführten Standardkonzentrationen verglichen.

Es wurden kommerzielle Assays der Firma R&D Systems zum Nachweis von PDGF-BB, CCL21 und CXCL12 verwendet. Diese wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.7 Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinmaterial

Zur histologischen Untersuchung wurde in Paraffin eingebettetes Lungengewebe von Patienten mit der gesicherten Diagnose einer IPAH bzw. CTEPH und Lungengewebe von Spenderlungen immunhistochemisch untersucht.

Hierzu wurden die Paraffinblöcke über 15 min. auf 0° C abgekühlt und das Material daraufhin mit dem Mikrotom in 3 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden in ein 40° C warmes Wasserbad überführt, auf Objektträger aufgezogen und auf der Wärmeplatte über 24 Stunden bei 40° C getrocknet.

Die Doppelfärbung erfolgte mit den Antikörpern gegen CD45 und Kollagen I nach folgendem Protokoll.

Zunächst wurden die Paraffinschnitte rehydriert (Tabelle 6)

Färbedauer (min.)	Reagenz
10	Rotihistol I
10	Rotihistol II
10	Rotihistol III
5	Ethanol 99,6 %
5	Ethanol 99,6 %
5	Ethanol 96 %
5	Ethanol 70 %
5	Aqua dest.

Tabelle 6 : Rehydrierung der Paraffinschnitte

Im nächsten Schritt wurden die Schnittpräparate in einen Färbecontainer mit 1 mM EDTA überführt und in einer Mikrowelle bei 630 W über 8 min. erhitzt. Dann wurde der Container mit den Schnitten bei Raumtemperatur über 30 min. abgekühlt und über 5 min. mit Aqua dest. gespült. Das Gewebe auf dem Objektträger wurde dann mit einem Fettstift eingekreist.

Die Antigenbindungsstellen wurden mit einem Gemisch aus zu gleichen Anteilen Ziegenerum und Histopuffer blockiert. Dieser Schritt erfolgte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Darauf wurden die Schnittpräparate kurz mit 1x PBS gewaschen und der Kollagen I-Antikörper (gelöst in Histopuffer) aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Präparate 3 x 3 min. in 1x PBS gespült, der Zweitantikörper (Alexa 555 gelöst in Histopuffer) aufgetragen und bei Raumtemperatur für 45 min. inkubiert. Wieder folgte ein Waschschrift mit 1x PBS (3 x 3 min.); der CD45 Antikörper (verdünnt mit Histopuffer) wurde aufgetragen und über Nacht bei 4° C inkubiert. Nochmals wurde 3 x 3 min. mit 1x PBS gespült und der verdünnte Alexa 488-Zweitantikörper für 45 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellkerne über 10 min. mit TO-PRO®-3 gefärbt, die Schnittpräparate ausgiebig gespült und mit Mounting Medium eingedeckelt. Die Färbungen wurden am Leica Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4.8 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Medianwert oder Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Die Daten wurden mittels one way analysis of variance (ANOVA) bzw. Students T-Test (Graph Pad Prism 5) analysiert. und grafisch in Form von Box-Whisker-Plot Diagrammen dargestellt.

Werte mit einem $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

Das Studienkollektiv setzte sich zusammen aus 29 IPAH-Patienten, 41 CTEPH-Patienten und 26 gesunden Probanden.

Das Durchschnittsalter der CTEPH-Patienten betrug 62 Jahre, der IPAH Patienten 50 Jahre und der gesunden Probanden 31 Jahre.

5.2 Quantitative Untersuchung sowie immunhistochemische Darstellung der adhärennten Zellen

Es wurden zirkulierende Fibrozyten aus peripherem Vollblut von Patienten mit IPAH und CTEPH sowie der Kontrollgruppe isoliert, mittels Immunfluoreszenz dargestellt und anschließend in der Neubauer-Zellkammer quantifiziert. Unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen zeigte ein Großteil der adhärennten Zellen stern- bzw. spindelförmige Zellausläufer, morphologisch dem Bild von Fibrozyten entsprechend. Als mesenchymale Marker wurden jeweils Prolyl 4-Hydroxylase (Abbildung 7) und Vimentin (Abbildung 8) verwendet.

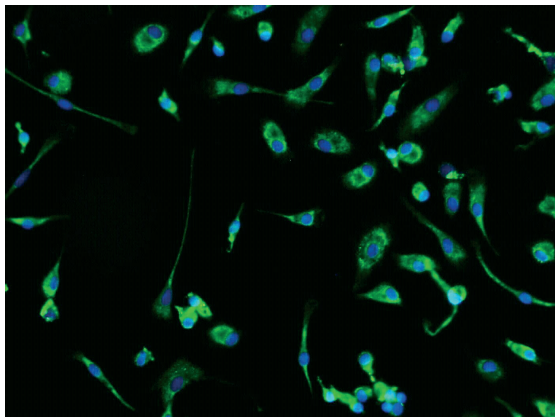
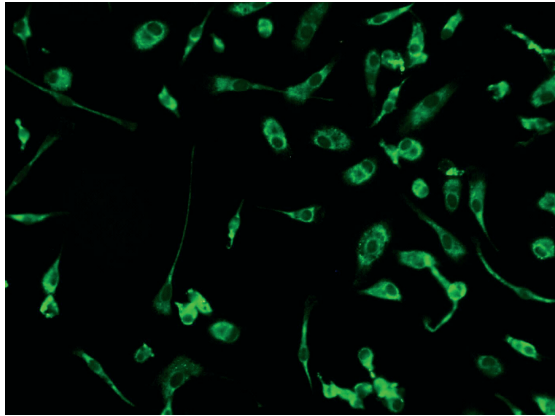
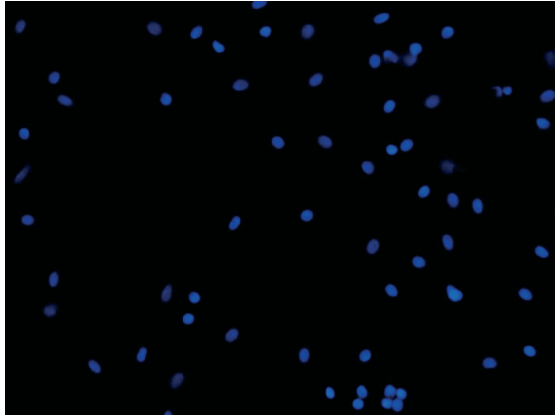


Abbildung 7: Expression von Prolyl 4-Hydroxylase (Anti-Fibroblast Antikörper) der adhärennten Zellen in Kultur nach 5 Tagen

20fach vergrößert; oben: Kernfärbung Hoechst 3342 (blau), mittig: Prolyl 4-Hydroxylase-Färbung (grün), unten: Kombination aus beiden.

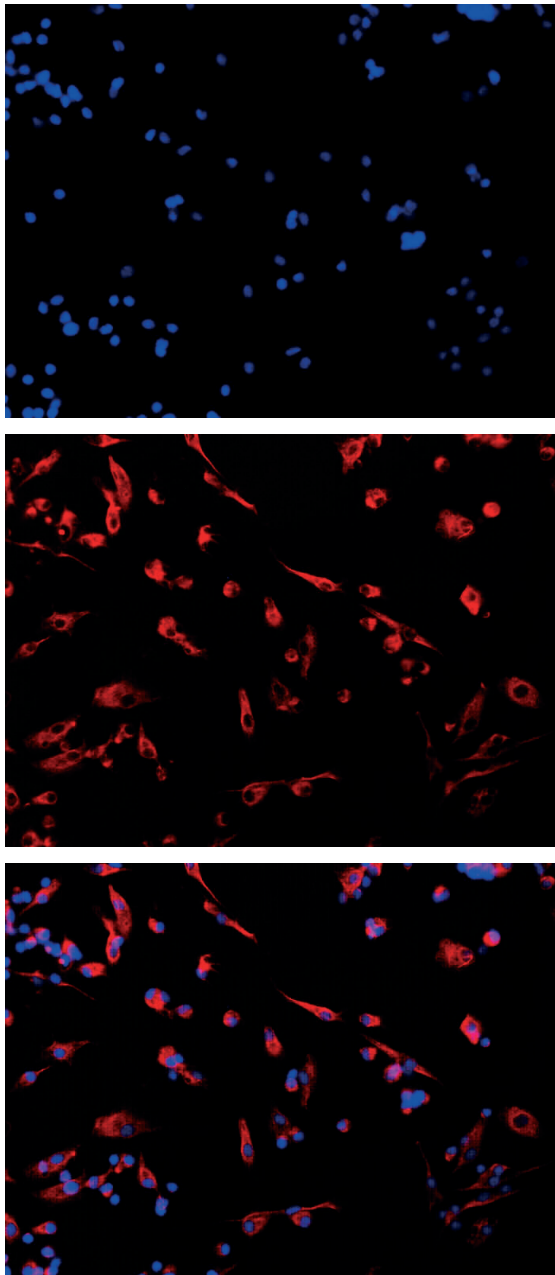


Abbildung 8: Expression von Vimentin der adhärennten Zellen in Kultur nach 5 Tagen

20fach vergrößert; oben: Kernfärbung Hoechst 3342 (blau), mittig: Vimentin-Färbung (rot), links: Kombination aus beiden.

Die definitive Herkunft der zirkulierenden Fibrozyten ist bislang ungeklärt. Unter der Annahme, dass zirkulierende Fibrozyten von einer Subpopulation von $CD14^{+}$ peripheren Blut-mononukleären-Zellen abstammen (Abe, Donnelly et al. 2001; Quan, Cowper et al. 2004), wurde in der Neubauer-Zählkammer die Anzahl aller adhärennten Zellen ermittelt. Hierdurch wurden noch die möglichen $CD14^{+}$ Vorläuferzellen erfasst, die *per definitionem* zur Population der zirkulierenden Fibrozyten gehören.

Es zeigten sich in der Auszählung keine statistisch signifikanten Differenzen in der Anzahl der adhärennten Zellen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Die Auswertung erfolgte mittels ANOVA (Abbildung 9).

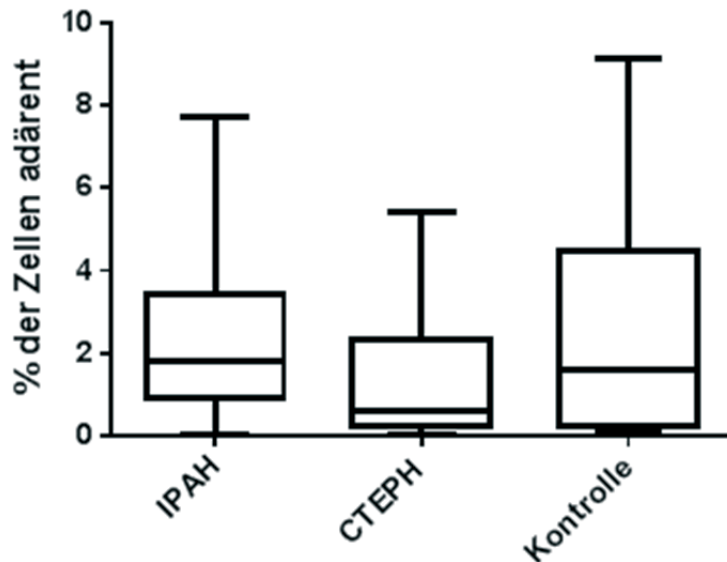


Abbildung 9: Box-Whisker-Plot Diagramm des prozentualen Anteils adhärennter Zellen

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen stellten sich nicht heraus. Angabe der Medianwerte und Quartile ($p > 0,05$)

5.3 MTT-Test

Ergänzend wurde vergleichend die Viabilität der adhärennten Zellen mittels MTT-Test fotometrisch ermittelt. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen herausgestellt werden. Die Auswertung erfolgte mittels ANOVA (Abbildung 10).

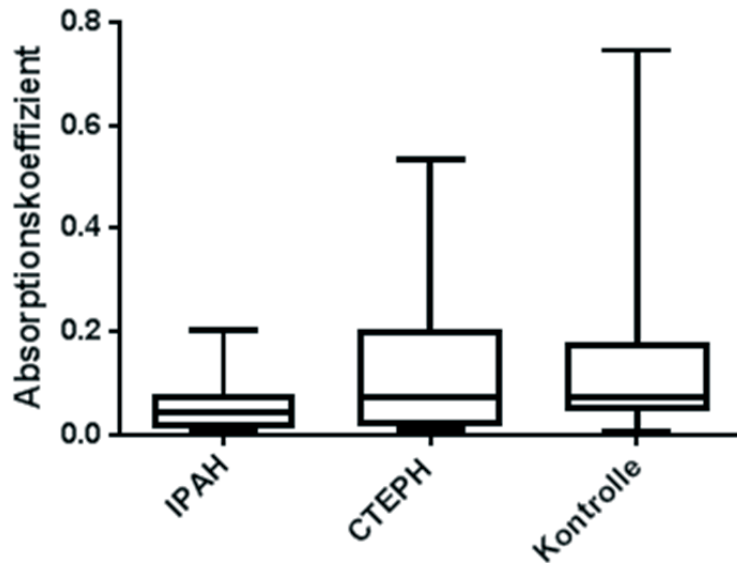


Abbildung 10: Box-Whisker-Plot Diagramm Viabilität der adhärennten Zellen (MTT Test)

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen stellten sich nicht heraus. Angabe der Medianwerte und Quartile ($p > 0,05$)

5.4 ELISA

Fibrozyten sezernieren u.a. den Faktor PDGF, der an der Migration und Proliferation von Endothelzellen, glattmuskulärer Zellen und Fibroblasten beteiligt ist (Heldin and Westermark 1999; Reigstad, Varhaug et al. 2005; Schermuly, Dony et al. 2005; Herzog and Bucala 2010).

Die Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten wird über Chemokinrezeptoren gelenkt, wobei sowohl der CCL21-CCR7-Achse als auch der CXCL12-CXCR4-Achse eine besondere Bedeutung zukommt (Abe, Donnelly et al. 2001; Phillips, Burdick et al. 2004).

Die Konzentrationen von PDGF-BB, CCL21 und CXCL12 wurden in dem gewonnenen PPP der IPAH- und CTEPH-Patienten sowie der gesunden Kontrollgruppe mittels ELISA bestimmt und jeweils mittels Students T-Test ausgewertet.

Bezüglich der Konzentrationen von PDGF-BB zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der IPAH-Patienten sowie der Kontrollgruppe und der CTEPH-Patienten (Abbildung 11 und 12). Eine signifikante Differenz zwischen den beiden Patientengruppen konnte nicht gemessen werden (Abbildung 13). Der Mittelwert in der IPAH-Gruppe betrug $257,9 \pm 36,86$ pg/ml, der CTEPH-Gruppe $279,8 \pm 48,99$ pg/ml und der gesunden Kontrollgruppe $145,8 \pm 26,87$ pg/ml.

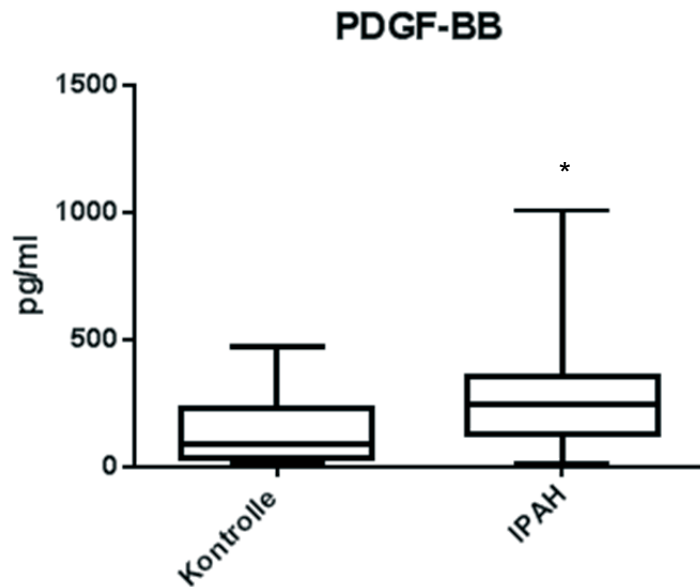


Abbildung 11: Box-Whisker-Plot Diagramm der PDGF-BB-Konzentrationen der Kontroll- und IPAH-Gruppe.

Angabe der Medianwerte und Quartile (*, $p < 0,001$)

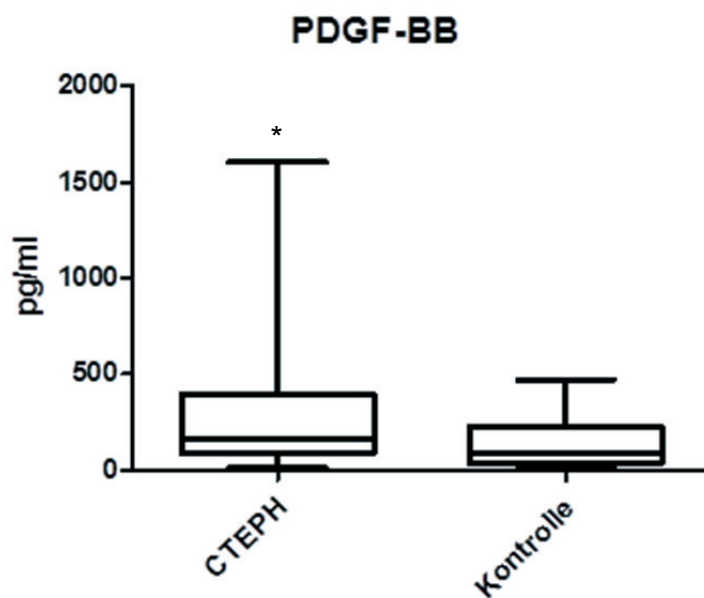


Abbildung 12: Box-Whisker-Plot Diagramm der PDGF-BB-Konzentrationen der CTEPH- und Kontroll-Gruppe

Angabe der Medianwerte und Quartile (*, $p < 0,05$)

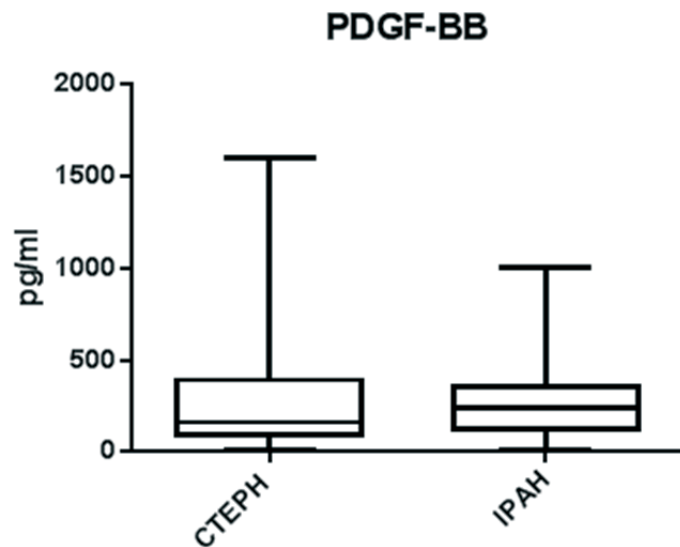


Abbildung 13: Box-Whisker-Plot Diagramm der PDGF-BB-Konzentrationen der CTEPH- und IPAH-Gruppe

Angabe der Medianwerte und Quartile ($p > 0,05$)

Auch in Hinblick auf die Konzentrationen von CCL21 fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der IPAH-Patienten sowie der Kontrollgruppe und der CTEPH-Patienten (Abbildung 14 und 15), wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen der IPAH- und CTEPH-Gruppe zeigte (Abbildung 16). Der Mittelwert in der IPAH-Gruppe betrug $577,0 \pm 57,30$ pg/ml, der CTEPH-Gruppe $777,6 \pm 79,09$ pg/ml und der gesunden Kontrollgruppe $328,4 \pm 29,08$ pg/ml.

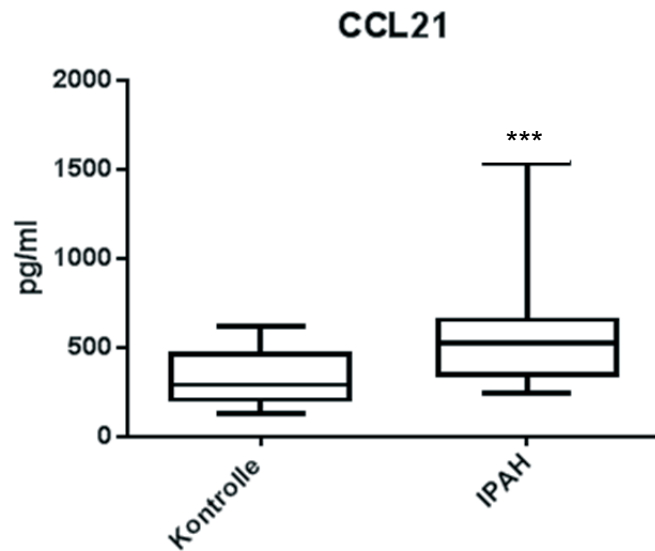


Abbildung 14: Box-Whisker-Plot Diagramm der CCL21-Konzentrationen der Kontroll- und IPAH-Gruppe

Angabe der Medianwerte und Quartile (***, $p < 0,001$)

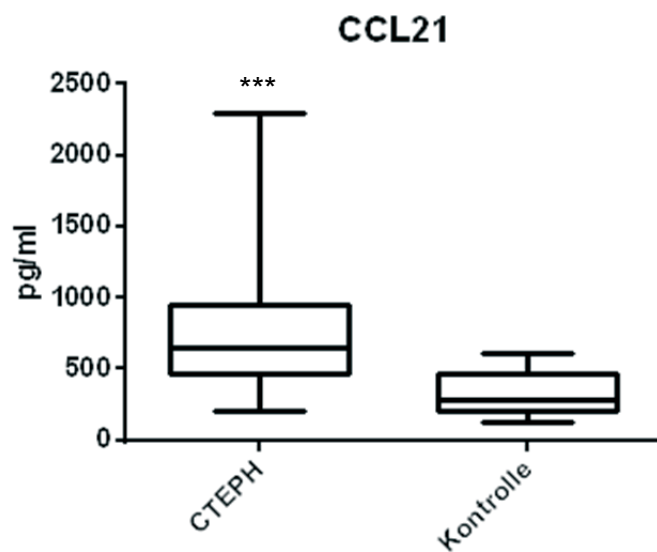


Abbildung 15: Box-Whisker-Plot Diagramm der CCL21-Konzentration der CTEPH- und Kontroll-Gruppe

Angabe der Medianwerte und Quartile (***, $p < 0,001$)

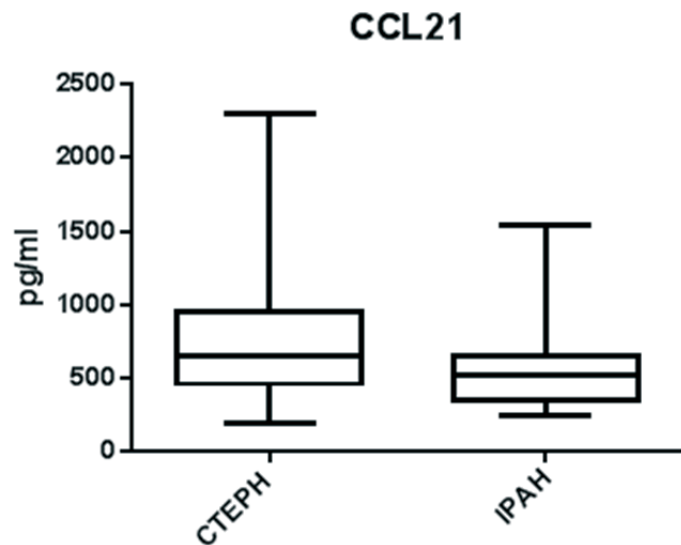


Abbildung 16: Box-Whisker-Plot Diagramm der CCL21-Konzentration der CTEPH- und IPAH-Gruppe

Angabe der Medianwerte und Quartile ($p > 0,05$)

Beim Vergleich der CXCL12-Konzentrationen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der IPAH-Patienten sowie der Kontrollgruppe und der CTEPH-Patienten festgestellt werden (Abbildung 17 und 18). Ein signifikanter Unterschied zwischen der IPAH- und CTEPH-Gruppe zeigte sich nicht (Abbildung 19). Der Mittelwert in der IPAH-Gruppe betrug $2146 \pm 94,19$ pg/ml, der CTEPH-Gruppe $2322 \pm 105,9$ pg/ml und der gesunden Kontrollgruppe $1826 \pm 78,40$ pg/ml.

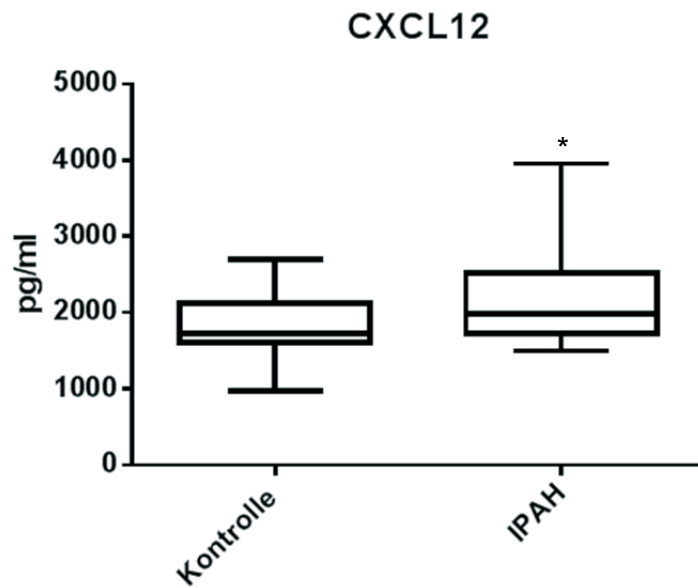


Abbildung 17: Box-Whisker-Plot Diagramm der CXCL12-Konzentration der Kontroll- und IPAH-Gruppe

Angabe der Medianwerte und Quartile (*, $p < 0,001$)

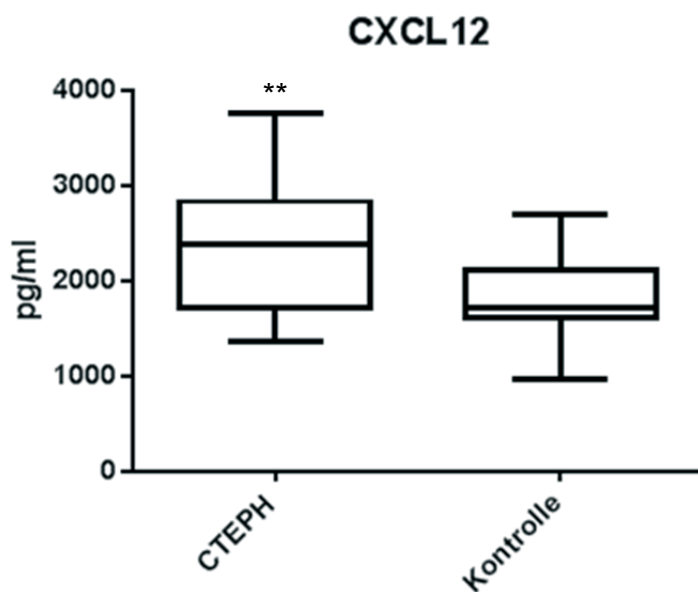


Abbildung 18: Box-Whisker-Plot Diagramm der CXCL12-Konzentration der CTEPH- und Kontroll-Gruppe

Angabe der Medianwerte und Quartile (**, $p < 0,01$)

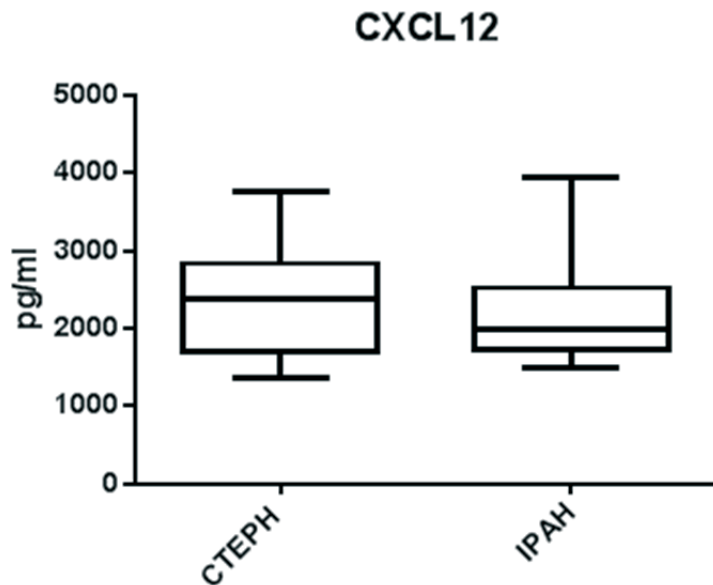


Abbildung 19: Box-Whisker-Plot Diagramm der CXCL12-Konzentration der CTEPH- und IPAH-Gruppe

Angabe der Medianwerte und Quartile ($p > 0,05$)

5.5 Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinmaterial

In dieser Arbeit sollte Lungengewebe von IPAH- und CTEPH-Patienten auf das Vorhandensein von Fibrozyten untersucht werden. Hierzu wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen CD45 und Kollagen I am Paraffinmaterial transplantierte Lungen und Spenderlungen durchgeführt. Der Nachweis einer gleichzeitigen Expression von CD45 und Kollagenen gilt als ausreichendes Kriterium zur Identifizierung von Fibrozyten (Moeller, Gilpin et al. 2009). Nur ganz umschrieben zeigten sich in Pulmonalarterien einzelne doppelpositive Signale. (Abbildung 20).

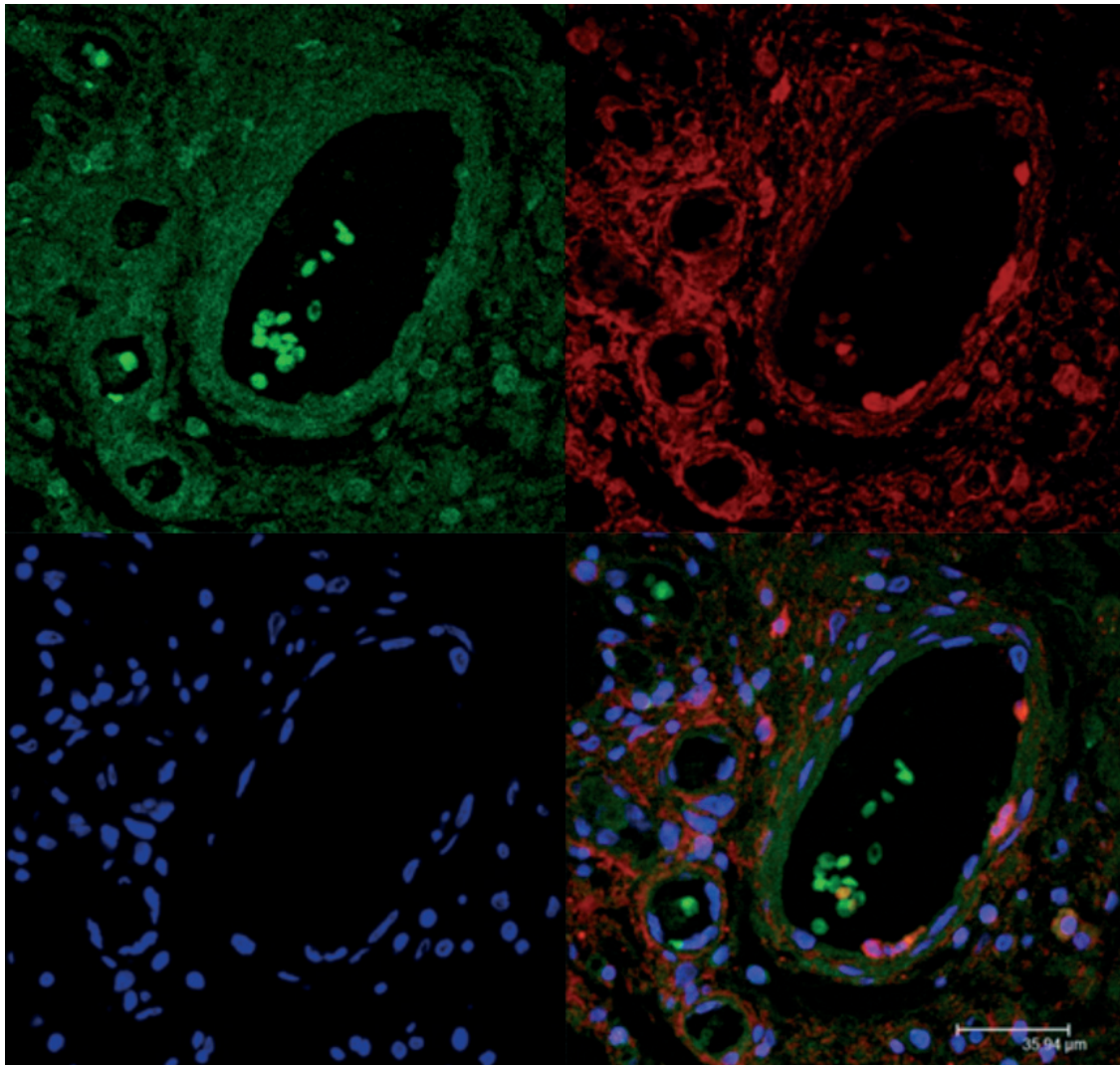


Abbildung 20: Doppelfärbung von CD45 und Kollagen I am Lungengewebe von IPAH-Patienten

Expression von CD45 (grün, oben links) und Kollagen I (rot, oben rechts), Färbung der Zellkerne (blau, unten links) und Kombination (unten rechts). In der Kombination zeigen sich ganz umschrieben einzelne rot-grüne Überlagerungen mit gelblichem Erscheinungsbild (Pfeile) als möglicher Hinweis auf das Vorhandensein zirkulierender Fibrozyten in Pulmonalarterien.

6 Diskussion

Beide Formen der PH, sowohl die IPAH, als auch die CTEPH, sind schwerwiegende Erkrankungen, denen pathophysiologisch ein Umbau insbesondere der kleinen Pulmonalarterien zugrunde liegt. Auch wenn sich der Auslösemechanismus des pulmonalvaskulären Remodelings jeweils unterscheidet, zeigen sich strukturelle Überschneidungen wie eine proliferative Intimafibrose, plexiforme Läsionen und intraluminale Thrombi (Galie and Kim 2006). Konsekutiv kommt es zu einer Druck- und Widerstandserhöhung der Pulmonalgefäße und einer erhöhten Rechtsherzbelastung, die letztlich zu einer Rechtsherzdekompensation führen kann .

Trotz inzwischen mehrerer verfügbarer Therapieoptionen gibt es bislang keine Möglichkeit einer Heilung der PAH (O'Callaghan, Savale et al. 2010). Bei der CTEPH gilt eine PEA als potenziell kurative Therapie. 20 - 40 % der CTEPH-Patienten sind jedoch inoperabel (Mayer 2010) und es wird eine medikamentöse Behandlung in Anlehnung an die PAH-Therapie empfohlen. Zudem zeigt sich bei 10 - 20 % der operierten Patienten eine persistierende PH (Bonderman, Jakowitsch et al. 2008).

Die etablierten medikamentösen Therapieansätze der PH basieren im Wesentlichen auf einer Wiederherstellung der Balance zwischen vasodilatativen und vasokonstriktiven Mediatoren.

Ein vielversprechender neuer Ansatz ist die mögliche Beteiligung extrapulmonaler Zellen in der Pathogenese der PH. Ein Einfluss von Fibrozyten konnte bereits bei fibroproliferativen Umbauprozessen unter anderem im Rahmen fibrosierender Lungenerkrankungen sowie des Asthma bronchiale beobachtet werden. Bezüglich der PH existieren bereits erste Studien, die mit dieser Arbeit um den vergleichenden Aspekt zwischen der humanen IPAH und CTEPH ergänzt wurden.

6.1 Das Studienkollektiv

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten mit einer nach klinischen Leitlinien gesicherten IPAH bzw. CTEPH, die an die Ambulanz für Pulmonale Hypertonie des Universitätsklinikums Gießen angeschlossen waren. Die Kontrollgruppe bestand aus klinisch gesunden Probanden. Insgesamt wurde das Blut von 96 Personen untersucht. Davon waren 29 IPAH-Patienten, 41 CTEPH-Patienten und 26 gesunde Probanden. Das Durchschnittsalter der CTEPH-Patienten betrug 62 Jahre, der IPAH Patienten 50 Jahre und der gesunden Probanden 31 Jahre. Ein limitierender Faktor dieser Arbeit besteht möglicherweise in dem verhältnismäßig jungen Durchschnittsalter der

gesunden Probandengruppe verglichen mit dem Durchschnittsalter der IPAH- und CTEPH-Patienten. Zwar konnten Yeager et al. eine Korrelation zwischen fortgeschrittenem Lebensalter und Fibrozytenzahl im peripheren Blut von Kindern und jungen Erwachsenen mit der Diagnose einer PAH zeigen (Yeager, Nguyen et al. 2012), jedoch liegen bislang keine verlässlichen Daten zu einem möglichen Zusammenhang zwischen Alter der Patienten und Anzahl oder Aktivität zirkulierender Fibrozyten vor.

6.2 Die vergleichende Quantifizierung der Fibrozyten *in vitro* und Untersuchung ihrer Viabilität

Die Anzahl zirkulierender Fibrozyten im peripheren Blut von IPAH-Patienten, CTEPH-Patienten und gesunden Probanden wurde im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* nach oben beschriebenem Verfahren ermittelt. Hierbei zeigte sich keine statistisch signifikante Differenz zwischen den einzelnen Gruppen. Parallel zu der Quantifizierung wurde die Viabilität der kultivierten zirkulierenden Fibrozyten mittels MTT Test untersucht. Auch hier zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bei insgesamt breiter Streuung der gemessenen Werte.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Gambaryan et al. 2012. In einer vergleichbaren Studie identifizierten sie zirkulierende Fibrozyten mittels Durchflusszytometrie im peripheren Blut von 20 PAH-Patienten und 18 gesunden Probanden. Quantifiziert wurden CD11b⁺, CD34⁺ und Vimentin⁺ Zellen. Die absolute Anzahl zirkulierender Fibrozyten pro Milliliter Blut wurde ermittelt und im Ergebnis zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Weiter wurde der prozentuale Anteil zirkulierender Fibrozyten bezüglich aller mononukleären Zellen bestimmt. Es konnte ein signifikant verminderter Anteil zirkulierender Fibrozyten im Blut der PAH-Patienten verglichen mit der gesunden Probandengruppe nachgewiesen werden. Auch die Fähigkeit der Zelldifferenzierung von Fibrozyten *in vitro* wurde untersucht. Hier zeigte sich eine geringe aber signifikante prozentuale Verminderung von CD45⁺ und Vimentin⁺ Spindelzellen in der Gruppe der PAH-Patienten (Gambaryan, Cohen-Kaminsky et al. 2012).

Andere Arbeitsgruppen hingegen kamen in vergleichbaren Untersuchungen zu offenbar widersprüchlichen Ergebnissen. So untersuchten 2012 Yeager et al. die Anzahl zirkulierender Fibrozyten im peripheren Blut von jugendlichen PAH-Patienten. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Anzahl zirkulierender Fibrozyten bei den PAH-Patienten (Yeager, Nguyen et al. 2012).

Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung, gemessen am mPAP, und der Anzahl zirkulierender Fibrozyten nachgewiesen werden. Zur Diskussion steht, ob eine niedrige Anzahl zirkulierender Fibrozyten im peripheren Blut möglicherweise durch eine verstärkte pulmonalvaskuläre Rekrutierung bedingt ist und ob es sich hierbei möglicherweise um ein transientes Geschehen handelt. Hierfür sprechen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Frid et al.. In ihren Untersuchungen zum Hypoxie-bedingten Remodeling konnten sie eine massive Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten in die pulmonalvaskuläre Adventitia von Kälbern und Ratten dokumentieren (Frid, Brunetti et al. 2006).

Zusammenfassend zeigt sich eine uneinheitliche Studienlage bezüglich der Anzahl zirkulierender Fibrozyten im peripheren Blut bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie bzw. Hypoxie-induziertem vaskulären Remodeling im Tiermodell. In der vorliegenden vergleichenden Untersuchung konnten zwischen den IPAH- und den CTEPH-Patienten sowie der gesunden Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede herausgearbeitet werden. Hier sind weitere klinische Studien mit ggf. größeren Patientenzahlen angebracht. Die Annahme, dass nicht die absolute Anzahl zirkulierender Fibrozyten im peripheren Blut, sondern deren Viabilität einen entscheidenden Einfluss auf das pulmonalvaskuläre Remodeling im Rahmen der IPAH und CTEPH nehmen könnte, konnte in dieser Arbeit nicht untermauert werden.

6.3 PDGF-BB im peripheren Blut von IPAH- und CTEPH- Patienten

In dieser Arbeit wurde mittels ELISA vergleichend die Konzentration des peptidergen Wachstumsfaktors PDGF-BB im Plasma der IPAH- und CTEPH- Patienten sowie der gesunden Kontrollgruppe untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Konzentration von PDGF-BB bei IPAH- und CTEPH- Patienten in gleicher Weise erhöht ist.

Kennzeichnend für die IPAH als auch für die CTEPH ist der Umbau von Pulmonalarterien mit Ausbildung einer Mediahypertrophie und bindegewebiger Intimaverbreiterung sowie fibroproliferativen Veränderungen der Adventitia. Es konnte eine Beteiligung von α -SMA⁺ Zellen an diesen Veränderungen nachgewiesen werden, wobei weder die Herkunft, noch die zugrunde liegenden Mechanismen, die zur Akkumulation dieser Zellen führen, bislang abschließend geklärt sind (Stenmark, Frid et al. 2010). Zirkulierende Fibrozyten besitzen die Fähigkeit, unter dem Einfluss von TGF- β 1 zu differenzieren und α -SMA zu exprimieren (Abe, Donnelly et al. 2001), was ihr Mitwirken am pulmonalvaskulären Remodeling vermuten lässt. Nikam et al. gelang

schließlich der Nachweis von Fibrozyten in Pulmonalgefäßen von Patienten mit PAH (Nikam, Schermuly et al. 2010).

Bei CTEPH-Patienten fanden Yao et al. am proximalen Anteil der betroffenen Pulmonalarterien aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzellen, die eine Koexpression von CD45 und Prokollagen I zeigen (Yao, Firth et al. 2009) und somit die Kriterien zur Identifizierung von Fibrozyten erfüllen (Moeller, Gilpin et al. 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Lungengewebe von transplantierten IPAH- bzw. CTEPH-Patienten immunhistochemisch mit den Antikörpern gegen CD45 und Kollagen I auf das Vorhandensein von Fibrozyten untersucht, wobei doppelpositive Signale nur ganz vereinzelt in Pulmonalarterien von IPAH-Patienten gezeigt werden konnten. Ein Nachweis von Fibrozyten in den Pulmonalarterien von CTEPH-Lungen oder Spenderlungen gelang nicht. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre u.a. das Phänomen, dass es mit fortschreitender Differenzierung von Fibrozyten zu einer Herabregulierung der hämatopoetischen Marker kommt (Schmidt, Sun et al. 2003; Phillips, Burdick et al. 2004; Quan, Cowper et al. 2004).

Perros et al. konnten zeigen, dass PDGF und PDGF-Rezeptor mRNA in Pulmonalarterien von Patienten mit pulmonaler Hypertonie überexprimiert ist und darüber hinaus immunhistochemisch nachweisen, dass PDGF/PDGFR in α -SMA⁺ Zellen lokalisiert ist (Perros, Montani et al. 2008). Die Annahme, dass es sich bei diesen α -SMA⁺ Zellen um transformierte zirkulierende Fibrozyten handelt, wird unter anderem gestützt durch Beobachtungen von Aono et al.. Dieser Arbeitsgruppe gelang der Nachweis einer Expression von PDGF-Rezeptoren in humanen und Mausfibrozyten (Aono 2009).

Darüber hinaus konnte die Chemotaxis von Fibrozyten hinsichtlich der PDGF-Liganden nachgewiesen und durch die Gabe von PDGF-spezifischen Antikörpern bzw. Imatinib in der Bleomycin-induzierten Fibrose verhindert werden (Aono 2009). Auch im Asthma-Modell zeigte sich, dass sekretiertes PDGF von glatten Muskelzellen der Atemwege einen Stimulus für die Migration von Fibrozyten darstellt (Saunders, Siddiqui et al. 2009).

Imatinib ist ein Proteinkinaseinhibitor, der bereits in der onkologischen Therapie Anwendung findet und im Rahmen erster klinischer Studien zur Therapie der PAH erprobt wurde. Der Wirkmechanismus von Imatinib besteht in der kompetitiven und selektiven Blockade spezifischer Tyrosinkinasen, u.a. von PDGF- β . Im Rahmen der IMPRES-Studie konnte gezeigt werden, dass Imatinib als Ergänzungstherapie bei schwerer PAH eine signifikante Verbesserung der Belastbarkeit und hämodynamischen Parameter der Patienten bewirkt (Hoeper, Barst et al. 2013).

In dieser Arbeit konnte sowohl im Blut von IPAH-Patienten als auch im Blut von CTEPH-Patienten eine signifikant erhöhte Konzentration von PDGF-BB gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Anzunehmen ist daher, dass ggf. auch CTEPH-Patienten von einer Therapie mit Imatinib profitieren könnten.

Ein direkter Zusammenhang zwischen ermittelter PDGF-BB-Konzentration und einer tatsächlichen Beteiligung zirkulierender Fibrozyten am PDGF-induzierten pulmonalvaskulären Remodeling sowohl im Rahmen der IPAH als auch der CTEPH konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, jedoch liefern unsere Ergebnisse in Zusammenschau mit den Erkenntnissen oben genannter Arbeitsgruppen hierfür einige Indizien.

6.4 CCL21 und CXCL12 im peripheren Blut von IPAH- und CTEPH- Patienten

Mittels ELISA wurde vergleichend die Konzentration der Chemokinliganden CCL21 und CXCL12 im Plasma der IPAH- und CTEPH- Patienten sowie der gesunden Kontrollgruppe untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Konzentration sowohl von CCL21 als auch von CXCL12 bei IPAH- und CTEPH- Patienten in gleicher Weise erhöht sind.

Chemokine sind eine Gruppe von Zytokinen oder kleine Proteine, die von Zellen sezerniert werden, die die Fähigkeit besitzen, eine gerichtete Chemotaxis zu induzieren. Daher werden sie auch chemotaktische Cytokine genannt. Bekannt sind minimal 40 Chemokinliganden und 20 Chemokinrezeptoren (Phillips, Burdick et al. 2003).

Zirkulierende Fibrozyten exprimieren an ihrer Oberfläche verschiedene Chemokinrezeptoren, unter anderem CCR7 und CXCR4, die über die jeweiligen Liganden CCL21 und CXCL12 wesentlich an der Rekrutierung aus dem Blut beteiligt sind (Herzog and Bucala 2010). Die CCL21-Konzentration im peripheren Blut der IPAH- und der CTEPH-Patienten sowie der Kontrollgruppe haben wir basierend auf den derzeitigen Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen interpretiert.

Die Arbeitsgruppe um Abe konnte 2001 *in vitro* nachweisen, dass CCL21 ein potenter Stimulus für die Fibrozytenmigration ist. Darüber hinaus konnte sie am Mausmodell zeigen, dass Fibrozyten in Abhängigkeit von CCL21 in frische Hautwunden einwandern (Abe, Donnelly et al. 2001). Auch bezüglich der interstitiellen Nierenfibrose wurde die Wirkung von CCL21 auf Fibrozyten näher beleuchtet. Wada et al. konnten eine Beteiligung zirkulierender Fibrozyten an den fibrotischen Umbauvorgängen der Niere in Abhängigkeit von CCL21 demonstrieren. Indem sie die CCL21-CCR7-Achse mittels

CCL21-Antikörpern blockierten konnten sie einen Rückgang der interstitiellen Nierenfibrose am Mausmodell induzieren (Wada, Sakai et al. 2007).

In dieser Arbeit konnte im Blut der IPAH- als auch der CTEPH Patienten eine signifikante Erhöhung der CCL21-Konzentration festgestellt werden, was die Vermutung nahelegt, dass die CCL21-CCR7-Achse, über die zirkulierende Fibrozyten rekrutiert werden, auch gleichermaßen bei diesen Formen der PH eine Rolle spielt.

Des Weiteren wurde die Konzentration des Chemokinliganden CXCL12, dessen Rezeptor CXCR4 an der Oberfläche zirkulierender Fibrozyten exprimiert wird, im Patientenblut bestimmt. Die Rolle der CXCL12-CXCR4-Achse bei der Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen näher betrachtet, wobei insbesondere die Ergebnisse bezüglich interstitieller Lungenerkrankungen für unsere Arbeit grundlegend waren (Phillips, Burdick et al. 2004; Mehrad, Burdick et al. 2007; Andersson-Sjöland, de Alba et al. 2008). Phillips et al. demonstrierten anhand der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose am Mausmodell die Beteiligung zirkulierender Fibrozyten und konnten deren Migration in Abhängigkeit von CXCL12 nachweisen. Sie konnten zeigen, dass die Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten direkt mit der Kollagenproduktion in der Lunge korreliert. Darüber hinaus konnten mittels spezifischer CXCL12-Antikörper die fibrotischen Umbauvorgänge in den Mäuselungen abgeschwächt werden (Phillips, Burdick et al. 2004).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen untersuchten Mehrad et al. Lungengewebe und Blut von Patienten mit gewöhnlicher interstitieller Pneumonie (UIP) und NSIP. Immunhistochemisch konnte am Paraffinmaterial der humanen Lungen eine vermehrte CXCL12-Expression festgestellt werden und auch im Blut beider Patientengruppen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der CXCL12-Konzentration, die mit einer erhöhten Anzahl zirkulierender Fibrozyten korrelierte (Mehrad, Burdick et al. 2007).

Andersson-Sjöland et al. gelang in ihrer Arbeit mit der Immunfluoreszenztechnik der Nachweis von Fibrozyten im Lungengewebe von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose, wobei sie doppeltpositive Zellen für CXCR4 und einem mesenchymalen Marker, bzw. CD34 oder CD45 mit einem mesenchymalen Marker identifizierten (Andersson-Sjöland, de Alba et al. 2008). Auch in späteren Untersuchungen am Mausmodell konnten Makino et al. die anti-fibrotische Wirkung spezifischer Antikörper gegen CXCR4 und der damit verbundenen Fibrozytenmigration belegen (Makino, Aono et al. 2013).

Zu einem möglichen Einfluss der CXCL12-CXCR4-Achse bei der PAH existieren bislang nur wenige Arbeiten. Interessanterweise konnten Yeager et al. in ihrer vergleichenden Untersuchung keinen Unterschied in der Plasmakonzentration von

CXCL12 bei Patienten mit PAH und der gesunden Kontrollgruppe feststellen (Yeager, Nguyen et al. 2012). Andere Arbeitsgruppen kamen hingegen zu offenbar widersprüchlichen Ergebnissen, die mit den Ergebnissen unserer Arbeit einhergehen und die These einer möglichen Beteiligung zirkulierender Fibrozyten beim pulmonalvaskulären Remodeling stützen.

So konnten Young et al. belegen, dass eine Blockade der CXCL12-CXCR4-Achse den Hypoxie-bedingten Umbau der Pulmonalarterien bei neugeborenen Mäusen verhindert und den pulmonalarteriellen Druck bei neugeborenen Mäusen mit etablierter PH signifikant senkt (Young, Torres et al. 2009).

Satoh et al. beobachteten in ihrer Arbeit die Abmilderung der Hypoxie-bedingten PH unter Pravastatin in Zusammenhang mit einem Rückgang der CXCL12-Konzentration im Blut und der Akkumulation von CXCR4+ Zellen in Mäuselungen (Satoh, Fukumoto et al. 2009).

Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind die Untersuchungen am Rattenmodell der Arbeitsgruppe um Yu et al.. Sie konnten zeigen, dass die Inhibition von CXCR4 signifikant die Hypoxie-bedingte PH, die rechtsventrikuläre Hypertrophie und das pulmonalvaskuläre Remodeling abmildert. Darüber hinaus elektroporierten sie shRNA in Knochenmarkszellen, um CXCR4 zu hemmen. Sie transplantierten die Knochenmarkszellen Ratten, deren Knochenmark vorab einer letalen Strahlendosis ausgesetzt wurde. Nach zwei Wochen unter Hypoxie zeigten die Ratten mit CXCR4 shRNA Knochenmarkszellen eine signifikant mildere PH, eine schwächere rechtsventrikuläre Hypertrophie und ein weniger ausgeprägtes pulmonalvaskuläres Remodelings im Vergleich zu Kontrolltieren, die Knochenmarkszellen mit *scrambled* shRNA oder ohne shRNA erhielten. Die Elektroporation mit CXCR4 shRNA betraf lediglich die Expression von CXCR4 in Knochenmarkszellen, was als direkter Beweis für eine Beteiligung von CXCR4 und Knochenmarkszellen in der Hypoxie-bedingten PH gesehen werden kann (Yu and Hales 2011).

In dieser Arbeit wurde der CXCR4-Ligand CXCL12 untersucht und festgestellt, dass dessen Konzentration im Blut sowohl von IPAH-Patienten, als auch von CTEPH-Patienten signifikant erhöht ist.

Auch wenn in beiden Patientengruppen eine erhöhte Anzahl zirkulierender Fibrozyten im peripheren Blut nicht nachgewiesen werden konnte, ist im Kontext der Ergebnisse oben genannter Arbeitsgruppen eine Beteiligung dieser Zelllinie gleichermaßen bei der IPAH als auch bei der CTEPH anzunehmen. Möglicherweise stellt die Unterbrechung der CXCL12-CXCR4-Achse bei der IPAH als auch bei der CTEPH eine therapeutische Option dar.

6.5 Ausblick

Die genaue Pathogenese der IPAH als auch der CTEPH ist bislang nicht hinreichend geklärt, wobei unsere Arbeit eine mögliche Beteiligung zirkulierender Fibrozyten gleichermaßen im Rahmen beider Kategorien der PH weiter untermauern konnte. Letztlich ist jedoch die Rolle zirkulierender Fibrozyten bei beiden Formen der pulmonalen Hypertonie nicht hinreichend verstanden und weitere Studien mit ggf. größeren Patientenzahlen sind angebracht.

Es sollte der relative Anteil von Fibrozyten, lokalen Vorläuferzellen sowie bereits vorhandenen Fibroblasten und glattmuskulären Zellen am pulmonalvaskulären Remodeling bei den verschiedenen Formen der PH ermittelt werden. Darüber hinaus sollten die Mechanismen der Fibrozytenmigration und deren Akkumulation näher beleuchtet werden. Darin eingeschlossen sind die Umstände ihres Austritts aus dem Knochenmark, ihrer Adhäsion an das Endothel und der genauen Mechanismen, die zu ihrem Austritt aus dem Blutkreislauf führen. Von besonderer Bedeutung ist dabei eine genaue Analyse der Reaktion zirkulierender Fibrozyten auf Chemokine bzw. deren Gradienten, da bereits vorliegende Studien und die Ergebnisse unserer Arbeit mögliche Ansätze für eine therapeutische Intervention bei der IPAH und CTEPH aufzeigen.

Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwerwiegende Erkrankung, die durch eine Druck- und Widerstandserhöhung in der pulmonalen Zirkulation charakterisiert ist. Sie wird in fünf Kategorien subklassifiziert. Die vorliegende Studie befasst sich vergleichend mit der pulmonalarteriellen Hypertonie, im Speziellen der idiopathischen pulmonalen Hypertonie (IPAH, Gruppe 1) sowie der chronischen thrombembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH, Gruppe 4). Beide Formen der PH weisen überschneidende strukturelle Veränderungen der Pulmonalgefäße auf, die mit einer Akkumulation glattmuskulärer Zellen und Bildung extrazellulärer Matrix einhergehen. Die Genese dieser Umbauprozesse ist bislang nicht eindeutig geklärt. In den letzten Jahren ist die mögliche Beteiligung zirkulierender mesenchymaler Vorläuferzellen, sogenannter Fibrozyten, in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Fibrozyten zeigen sowohl die Eigenschaften von Leukozyten als auch von Fibroblasten und besitzen die Fähigkeit, zu Myofibroblasten zu differenzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zirkulierende Fibrozyten aus peripher-venösem Blut von IPAH- und CTEPH-Patienten isoliert und quantifiziert. Als Kontrollgruppe dienten freiwillige, gesunde Probanden. Es zeigte sich keine signifikante Differenz in der Fibrozytenzahl bzw. der adhärenenten Zellen in Kultur, was möglicherweise auf eine gesteigerte zentrale Rekrutierung zurückzuführen ist.

Darüber hinaus wurde mittels ELISA die Konzentration des peptidergen Wachstumsfaktors PDGF-BB sowie der Chemokinliganden CCL21 und CXCL12, deren Rezeptoren an der Fibrozytenoberfläche exprimiert werden, im Plasma bestimmt. Es konnten jeweils signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der IPAH-Patienten sowie der Gruppe der CTEPH-Patienten nachgewiesen werden. Eine signifikante Differenz zwischen den beiden Patientengruppen zeigte sich nicht.

Auch wenn ein direkter Zusammenhang zwischen ermittelter PDGF-Konzentration und einer tatsächlichen Beteiligung von Fibrozyten bislang nicht eindeutig geklärt werden konnte, geben die gewonnenen Erkenntnisse Grund zur Annahme, dass sowohl IPAH- als auch CTEPH-Patienten von einer Therapie mit Imatinib profitieren könnten.

Die Ergebnisse legen weiterhin nahe, dass zirkulierende Fibrozyten sowohl bei der IPAH als auch bei der CTEPH vermehrt rekrutiert werden und eine Unterbrechung der CCL21-CCR7-Achse bzw. der CXCL12-CXCR4-Achse ein mögliches therapeutisches Target darstellt.

Summary

Pulmonary hypertension (PH) is a serious disease characterized by increased pressure and resistance in the pulmonary circulation. It is sub-classified into five categories. This study deals comparatively with pulmonary arterial hypertension and in particular with idiopathic pulmonary hypertension (IPAH, group 1) and chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH, group 4). Both forms of PH demonstrate overlapping structural changes in the pulmonary vessels, which are accompanied by an accumulation of smooth muscle cells and the formation of extra-cellular matrices. The pathogenesis of these remodeling processes has so far not been fully understood.

In the last few years scientific attention has focused on the possible involvement of circulating mesenchymal precursor cells, so-called fibrocytes. Fibrocytes demonstrate characteristics of both leucocytes and of fibroblasts and are able to differentiate to myofibroblasts.

In the present work, circulating peripheral venous blood fibrocytes from IPAH and CTEPH patients were isolated and quantified. Healthy volunteer test persons served as a control group. No significant difference in numbers of fibrocytes or adherent cells was found in culture, which may be an indication of their increased central recruitment.

In addition, the plasma concentrations of platelet-derived growth factor PDGF-BB and the chemokine ligands CCL21 and CXCL12, whose receptors are expressed on the fibrocyte surface, were determined by ELISA. Significant differences between the control group and the IPAH patient group and the group of CTEPH patients, respectively, were found. There was no significant difference between the two patient groups.

Even though a direct correlation between the determined PDGF concentrations and a real involvement of fibrocytes could so far not be fully determined, the results provide reason to assume that both IPAH and CTEPH patients could profit from treatment with imatinib.

The findings also suggest that increased recruitment of circulating fibrocytes occurs in both IPIAH and CTEPH and that inhibition of the CCL21-CCR7 axis or the CXCL12-CXCR4 axis may represent a potential therapeutic target.

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
α -SMA	α -smooth muscle actin
ALK1	Activin Receptor-Like Kinase 1
ANOVA	one way analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
BCR-ABL	Bcr-Abl-Tyrosinkinase
b-FGF	basic fibroblast growth factor
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CCL	CC Ligand
CCR	CC Rezeptor
CD	cluster of differentiation
c-kit	Tyrosinkinase KIT (CD117)
CML	chronische myeloische Leukämie
CXCL12	stromal-derived factor (SDF-1 α)
CXCR	CXC Rezeptor
CTEPH	chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ENG	Endoglin-Gen
ET	Endothelinrezeptor
FCS	fetal calf serum
FEV1	Einsekundenkapazität
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HGF	hepatocyte growth factor
HHT	hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie
HPAH	hereditäre pulmonalarterielle Hypertonie
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

IPAH	idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MCSF	macrophage-colony stimulating factor
MHC II	major histocompatibility complex class II
MIP	macrophage inflammatory protein
mPAP	mean pulmonary arterial pressure
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid)
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NSIP	nichtspezifische interstitielle Pneumonie
PAH	pulmonalerterielle Hypertonie
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PEA	pulmonale Endarteriektomie
PH	pulmonale Hypertonie
PPP	platelet poor plasma
RBC	red blood cells
SAP	serum amyloid P
sCG	soluble guanylyl cyclase
SEM	standard error of the mean
sPAP	systemischer pulmonalerterieller Druck
SVD	small vessel disease
TGF- β	transforming growth factor β
TNF	Tumornekrosefaktor
UIP	usual interstitial pneumonia
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VSMC	vascular smooth muscle cell

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histomorphologische Merkmale der PAH.....	5
Abbildung 2: Histomorphologische Merkmale der CTEPH	6
Abbildung 3: Molekulare Mechanismen der Pathogenese der pulmonalarteriellen Hypertonie und daraus abgeleitete therapeutische Angriffspunkte (Humbert, Morrell et al. 2004).....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der PDGF-bedingten Veränderungen in Pulmonalgefäßen bei der PAH.	12
Abbildung 5: Übersicht über die Differenzierung, Rekrutierung und Funktion von Fibrozyten.....	16
Abbildung 6: Darstellung der Isolation von PBMC aus Vollblut.....	27
Abbildung 7: Expression von Prolyl 4-Hydroxylase (Anti-Fibroblast Antikörper) der adhärenen Zellen in Kultur nach 5 Tagen	33
Abbildung 8: Expression von Vimentin der adhärenen Zellen in Kultur nach 5 Tagen	34
Abbildung 9: Box-Whisker-Plot Diagramm des prozentualen Anteils adhärenen Zellen.....	35
Abbildung 10: Box-Whisker-Plot Diagramm Viabilität der adhärenen Zellen (MTT Test).....	36
Abbildung 11: Box-Whisker-Plot Diagramm der PDGF-BB-Konzentrationen der Kontroll- und IPAH-Gruppe.....	37
Abbildung 12: Box-Whisker-Plot Diagramm der PDGF-BB-Konzentrationen der CTEPH- und Kontroll-Gruppe.....	37
Abbildung 13: Box-Whisker-Plot Diagramm der PDGF-BB-Konzentrationen der CTEPH- und Kontroll-Gruppe.....	38
Abbildung 14: Box-Whisker-Plot Diagramm der CCL21-Konzentrationen der Kontroll- und IPAH-Gruppe.....	39
Abbildung 15: Box-Whisker-Plot Diagramm der CCL21-Konzentration der CTEPH- und Kontroll-Gruppe.....	39
Abbildung 16: Box-Whisker-Plot Diagramm der CCL21-Konzentration der CTEPH- und IPAH-Gruppe.....	40
Abbildung 17: Box-Whisker-Plot Diagramm der CXCL12-Konzentration der Kontroll- und IPAH-Gruppe.....	41

Abbildung 18: Box-Whisker-Plot Diagramm der CXCL12-Konzentration der CTEPH- und Kontroll-Gruppe.....	41
Abbildung 19: Box-Whisker-Plot Diagramm der CXCL12-Konzentration der CTEPH- und IPAH-Gruppe.....	42
Abbildung 20: Doppelfärbung von CD45 und Kollagen I am Lungengewebe von IPAH-Patienten.....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktionelle Schweregrade der pulmonalen Hypertonie.....	2
Tabelle 2: Klassifikation der PH.....	3
Tabelle 3: Graduierung der pulmonalarteriellen Hypertonie	6
Tabelle 4: Oberflächenmarker zirkulierender Fibrozyten	15
Tabelle 5: Antikörper Fibrozytenfärbung.....	23
Tabelle 6: Rehydrierung der Paraffinschnitte.....	30

Literaturverzeichnis

- Abe, R., S. C. Donnelly, et al. (2001). "Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites." J Immunol **166**(12): 7556-7562.
- Abe, R., S. C. Donnelly, et al. (2001). "Peripheral Blood Fibrocytes: Differentiation Pathway and Migration to Wound Sites." The Journal of Immunology **166**(12): 7556-7562.
- Aiba, S. and H. Tagami (1997). "Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids." J Cutan Pathol **24**(2): 65-69.
- Andersson-Sjoland, A., C. G. de Alba, et al. (2008). "Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis." Int J Biochem Cell Biol **40**(10): 2129-2140.
- Aono, Y., Nishioka, et al. (2009). "Inhibition of PDGF-Mediated Recruitment of Fibrocytes by Imatinib in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice." Am J Respir Crit Care Med **179**.
- Barst, R. J. (2005). "PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension." J Clin Invest **115**(10): 2691-2694.
- Barst, R. J., M. McGoon, et al. (2004). "Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **43**(12 Suppl S): 40S-47S.
- Bergovec, M., M. Udovicic, et al. (2011). "[European guidelines on the diagnosis and management of pulmonary embolism]." Lijec Vjesn **133**(3-4): 140-146.
- Bonderman, D., J. Jakowitsch, et al. (2008). "Role for staphylococci in misguided thrombus resolution of chronic thromboembolic pulmonary hypertension." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(4): 678-684.
- Bucala, R., L. A. Spiegel, et al. (1994). "Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair." Mol Med **1**(1): 71-81.
- Budhiraja, R., R. M. Tuder, et al. (2004). "Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension." Circulation **109**(2): 159-165.
- Burke, D. L., M. G. Frid, et al. (2009). "Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(2): L238-250.
- Capdeville, R., E. Buchdunger, et al. (2002). "Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug." Nat Rev Drug Discov **1**(7): 493-502.
- Chesney, J., M. Bacher, et al. (1997). "The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6307-6312.
- Cowper, S. E., R. Bucala, et al. (2005). "Case 35-2004: nephrogenic fibrosing dermatopathy." N Engl J Med **352**(16): 1723-1724; author reply 1723-1724.
- Du, L., C. C. Sullivan, et al. (2003). "Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension." N Engl J Med **348**(6): 500-509.

-
- Eddahibi, S., M. Humbert, et al. (2001). "Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension." J Clin Invest **108**(8): 1141-1150.
- Frid, M. G., J. A. Brunetti, et al. (2006). "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage." Am J Pathol **168**(2): 659-669.
- Galan, A., S. E. Cowper, et al. (2006). "Nephrogenic systemic fibrosis (nephrogenic fibrosing dermopathy)." Curr Opin Rheumatol **18**(6): 614-617.
- Galie, N., M. M. Hoeper, et al. (2009). "Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension." Eur Respir J **34**(6): 1219-1263.
- Galie, N., M. Humbert, et al. (2002). "Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." J Am Coll Cardiol **39**(9): 1496-1502.
- Galie, N. and N. H. Kim (2006). "Pulmonary microvascular disease in chronic thromboembolic pulmonary hypertension." Proc Am Thorac Soc **3**(7): 571-576.
- Galie, N., A. Manes, et al. (2003). "Prostanoids for pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Med **2**(2): 123-137.
- Gambaryan, N., S. Cohen-Kaminsky, et al. (2012). "Circulating fibrocytes and pulmonary arterial hypertension." Eur Respir J **39**(1): 210-212.
- Ghofrani, H. A., A. M. D'Armini, et al. (2013). "Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension." N Engl J Med **369**(4): 319-329.
- Ghofrani, H. A., N. Galie, et al. (2013). "Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **369**(4): 330-340.
- Ghofrani, H. A., N. W. Morrell, et al. (2010). "Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy." Am J Respir Crit Care Med **182**(9): 1171-1177.
- Ghofrani, H. A., W. Seeger, et al. (2005). "Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **353**(13): 1412-1413.
- Ghofrani, H. A., R. Voswinckel, et al. (2004). "Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study." J Am Coll Cardiol **44**(7): 1488-1496.
- Giaid, A., M. Yanagisawa, et al. (1993). "Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension." N Engl J Med **328**(24): 1732-1739.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.
- Grimminger, F., G. Weimann, et al. (2009). "First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension." Eur Respir J **33**(4): 785-792.
- Grobner, T. (2006). "Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?" Nephrol Dial Transplant **21**(4): 1104-1108.
- Guignabert, C., B. Raffestin, et al. (2005). "Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." Circulation **111**(21): 2812-2819.

-
- Hashimoto, N., H. Jin, et al. (2004). "Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis." J Clin Invest **113**(2): 243-252.
- Heath, D. and J. E. Edwards (1958). "The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects." Circulation **18**(4 Part 1): 533-547.
- Heldin, C. H. and B. Westermarck (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." Physiol Rev **79**(4): 1283-1316.
- Herve, P., J. M. Launay, et al. (1995). "Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension." Am J Med **99**(3): 249-254.
- Herzog, E. L. and R. Bucala (2010). "Fibrocytes in health and disease." Exp Hematol **38**(7): 548-556.
- Hoeper, M. M., R. J. Barst, et al. (2013). "Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study." Circulation **127**(10): 1128-1138.
- Hoeper, M. M., E. Mayer, et al. (2006). "Chronic thromboembolic pulmonary hypertension." Circulation **113**(16): 2011-2020.
- Humbert, M., N. W. Morrell, et al. (2004). "Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **43**(12 Suppl S): 13S-24S.
- Humbert, M., O. Sitbon, et al. (2004). "Treatment of pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **351**(14): 1425-1436.
- Ishida, Y., A. Kimura, et al. (2009). "Detection of fibrocytes in human skin wounds and its application for wound age determination." Int J Legal Med **123**(4): 299-304.
- Jamieson, S. W., D. P. Kapelanski, et al. (2003). "Pulmonary endarterectomy: experience and lessons learned in 1,500 cases." Ann Thorac Surg **76**(5): 1457-1462; discussion 1462-1454.
- Jonigk, D., H. Golpon, et al. (2011). "Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension composition, architecture, and microenvironment." Am J Pathol **179**(1): 167-179.
- Jonigk, D., M. M. Hoeper, et al. (2012). "[Histopathological aspects of pulmonary hypertension]." Pathologe **33**(3): 183-191.
- Leschke, M., A. Wadlich, et al. (2009). "[Diagnostics in pulmonary hypertension]." Internist (Berl) **50**(9): 1086, 1088-1090, 1092-1100.
- Machado, R. D., O. Eickelberg, et al. (2009). "Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **54**(1 Suppl): S32-42.
- Makino, H., Y. Aono, et al. (2013). "Antifibrotic effects of CXCR4 antagonist in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." J Med Invest **60**(1-2): 127-137.
- Mathai, S. K., M. Gulati, et al. (2010). "Circulating monocytes from systemic sclerosis patients with interstitial lung disease show an enhanced profibrotic phenotype." Lab Invest **90**(6): 812-823.
- Mayer, E. (2010). "Surgical and post-operative treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension." Eur Respir Rev **19**(115): 64-67.
- McLaughlin, V. V., K. W. Presberg, et al. (2004). "Prognosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines." Chest **126**(1 Suppl): 78S-92S.

-
- Mehrad, B., M. D. Burdick, et al. (2007). "Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease." Biochem Biophys Res Commun **353**(1): 104-108.
- Moeller, A., S. E. Gilpin, et al. (2009). "Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **179**(7): 588-594.
- Mori, L., A. Bellini, et al. (2005). "Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow." Exp Cell Res **304**(1): 81-90.
- Nihlberg, K., K. Larsen, et al. (2006). "Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane?" Respir Res **7**: 50.
- Nikam, V. S., R. T. Schermuly, et al. (2010). "Treprostinil inhibits the recruitment of bone marrow-derived circulating fibrocytes in chronic hypoxic pulmonary hypertension." Eur Respir J **36**(6): 1302-1314.
- O'Callaghan, D. S., L. Savale, et al. (2010). "Evidence for the use of combination targeted therapeutic approaches for the management of pulmonary arterial hypertension." Respir Med **104 Suppl 1**: S74-80.
- Ogawa, A., K. Nakamura, et al. (2005). "Prednisolone inhibits proliferation of cultured pulmonary artery smooth muscle cells of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension." Circulation **112**(12): 1806-1812.
- Olschewski, H. (2008). "[Dana Point: what is new in the diagnosis of pulmonary hypertension?]." Dtsch Med Wochenschr **133 Suppl 6**: S180-182.
- Olschewski, H., M. M. Hoeper, et al. (2007). "[Diagnosis and therapy of chronic pulmonary hypertension]." Clin Res Cardiol **96**(5): 301-330.
- Patterson, K. C., A. Weissmann, et al. (2006). "Imatinib mesylate in the treatment of refractory idiopathic pulmonary arterial hypertension." Ann Intern Med **145**(2): 152-153.
- Perros, F., D. Montani, et al. (2008). "Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **178**(1): 81-88.
- Phillips, R. J., M. D. Burdick, et al. (2004). "Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis." J Clin Invest **114**(3): 438-446.
- Phillips, R. J., M. D. Burdick, et al. (2003). "The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases." Am J Respir Crit Care Med **167**(12): 1676-1686.
- Pilling, D., C. D. Buckley, et al. (2003). "Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P." J Immunol **171**(10): 5537-5546.
- Pilling, D., N. M. Tucker, et al. (2006). "Aggregated IgG inhibits the differentiation of human fibrocytes." J Leukoc Biol **79**(6): 1242-1251.
- Quan, T. E., S. Cowper, et al. (2004). "Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **36**(4): 598-606.
- Quan, T. E., S. Cowper, et al. (2004). "Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood." Int J Biochem Cell Biol **36**(4): 598-606.
- Reichenberger, F. and R. Voswinckel (2011). "[Pulmonary arterial hypertension]." Internist (Berl) **52**(4): 405-414; quiz 415.

-
- Reigstad, L. J., J. E. Varhaug, et al. (2005). "Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family." FEBS J **272**(22): 5723-5741.
- Russo, R., H. Medbury, et al. (2007). "Lack of increased expression of cell surface markers for circulating fibrocyte progenitors in limited scleroderma." Clin Rheumatol **26**(7): 1136-1141.
- Sanchez, O., E. Marcos, et al. (2007). "Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **176**(10): 1041-1047.
- Satoh, K., Y. Fukumoto, et al. (2009). "Statin ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension associated with down-regulated stromal cell-derived factor-1." Cardiovasc Res **81**(1): 226-234.
- Saunders, R., S. Siddiqui, et al. (2009). "Fibrocyte localization to the airway smooth muscle is a feature of asthma." J Allergy Clin Immunol **123**(2): 376-384.
- Schermuly, R. T., E. Dony, et al. (2005). "Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition." J Clin Invest **115**(10): 2811-2821.
- Schermuly, R. T., W. Janssen, et al. (2011). "Riociguat for the treatment of pulmonary hypertension." Expert Opin Investig Drugs **20**(4): 567-576.
- Schmidt, M., G. Sun, et al. (2003). "Identification of Circulating Fibrocytes as Precursors of Bronchial Myofibroblasts in Asthma." The Journal of Immunology **171**(1): 380-389.
- Schmidt, M., G. Sun, et al. (2003). "Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma." J Immunol **171**(1): 380-389.
- Simonneau, G., M. A. Gatzoulis, et al. (2013). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol **62**(25 Suppl): D34-41.
- Sitbon, O., M. Humbert, et al. (2005). "Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Circulation **111**(23): 3105-3111.
- Souza, R., O. Sitbon, et al. (2006). "Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension." Thorax **61**(8): 736.
- Stenmark, K. R., M. G. Frid, et al. (2010). "Fibrocytes: potential new therapeutic targets for pulmonary hypertension?" Eur Respir J **36**(6): 1232-1235.
- Tacke, F. and G. J. Randolph (2006). "Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets." Immunobiology **211**(6-8): 609-618.
- Tantini, B., A. Manes, et al. (2005). "Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells." Basic Res Cardiol **100**(2): 131-138.
- Tapson, V. F., F. Torres, et al. (2012). "Oral treprostinil for the treatment of pulmonary arterial hypertension in patients on background endothelin receptor antagonist and/or phosphodiesterase type 5 inhibitor therapy (the FREEDOM-C study): a randomized controlled trial." Chest **142**(6): 1383-1390.
- Vakil, V., J. J. Sung, et al. (2009). "Gadolinium-containing magnetic resonance image contrast agent promotes fibrocyte differentiation." J Magn Reson Imaging **30**(6): 1284-1288.
- Wada, T., N. Sakai, et al. (2007). "Fibrocytes: a new insight into kidney fibrosis." Kidney Int **72**(3): 269-273.

-
- Wang, C. H., C. D. Huang, et al. (2008). "Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction." Am J Respir Crit Care Med **178**(6): 583-591.
- Yang, L., P. G. Scott, et al. (2005). "Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar." Wound Repair Regen **13**(4): 398-404.
- Yang, L., P. G. Scott, et al. (2002). "Peripheral blood fibrocytes from burn patients: identification and quantification of fibrocytes in adherent cells cultured from peripheral blood mononuclear cells." Lab Invest **82**(9): 1183-1192.
- Yao, W., A. L. Firth, et al. (2009). "Identification of putative endothelial progenitor cells (CD34+CD133+Flk-1+) in endarterectomized tissue of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **296**(6): L870-878.
- Yeager, M. E., C. M. Nguyen, et al. (2012). "Circulating fibrocytes are increased in children and young adults with pulmonary hypertension." Eur Respir J **39**(1): 104-111.
- Young, K. C., E. Torres, et al. (2009). "Inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis attenuates neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension." Circ Res **104**(11): 1293-1301.
- Yu, L. and C. A. Hales (2011). "Effect of chemokine receptor CXCR4 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats." Respir Res **12**: 21.

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

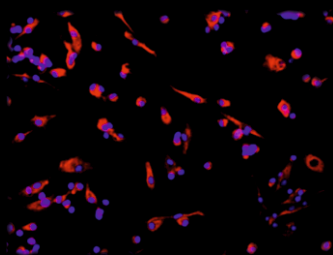
Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Voswinckel für die Überlassung des Themas und die anregende Hilfestellung bei dieser Dissertation bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. W. Seeger danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung von technischen Mitteln im Labor.

Außerdem danke ich Frau V. Nikam und der AG Mayer, insbesondere Frau A. Mohr, für die sorgfältige Einarbeitung in grundlegende Arbeitstechniken, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für zahlreiche fachliche Gespräche.

Besonders erwähnt sei auch an dieser Stelle die Zusammenarbeit mit dem Team der Ambulanz für Pulmonale Hypertonie des Universitätsklinikums Gießen, für die ich mich ganz herzlich bedanken möchte.

Nicht zuletzt gilt der größte Dank meinem Mann Andreas Müller, der mir immer eine unverzichtbare Unterstützung war und der mir zu jeder Zeit meiner Ausbildung uneingeschränkten Rückhalt bot.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6196-8



9 783835 961968